

Die Rolle von Meis2 als Ko-Transkriptionsfaktor bei der Entwicklung des anterioren Zentralnervensystems

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15
der Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt am Main

von **Zsuzsa Agoston**
geb. in Tirgu Mures, Rumänien

Frankfurt am Main, 2009
D 30

vom Fachbereich Biowissenschaften (15)
der Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. V. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Heinz Wässle

Prof. Dr. Hermann Rohrer

Datum der Disputation:

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
DIAGRAMMVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Entwicklung des zentralen Nervensystems von Vertebraten.....	1
1.2 Aufbau und Funktion des Tectum opticums.....	2
1.3 Die Entwicklung des Mittelhirns.....	5
1.3.1 Die Mittel-Hinterhirn Grenze als Organisator der Mittel-Hinterhirn Region	5
1.3.2 Entstehung und Funktion des Mittel-Hinterhirn Organisators.....	6
1.3.3 Fgf8 und die organisatorische Aktivität des MHO	11
1.4 Homeodomänenproteine und die Embryonalentwicklung	12
1.4.1 Otx2 und die Festlegung anteriorer Hirnstrukturen	13
1.4.2 Pax-Proteine.....	15
1.4.3 Meis-Proteine.....	17
1.5 Zielsetzung	19
2. MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte und Hilfsmittel	20
2.1.2 Chemikalien.....	21
2.1.3 Komplettsysteme	22
2.1.4 Lösungen	22
2.1.5 Plasmide zur Herstellung von DNA-Konstrukten	27
2.1.6 Plasmide zur Herstellung von RNA-Sonden	27
2.1.7 Expressionskonstrukte für die Elektroporation.....	28
2.1.8 Expressionskonstrukte für Reporteranalysen.....	29
2.1.9 Viren für die Injektion	30
2.1.10 Expressionskonstrukte für die Protein-Interaktionsstudien	30
2.1.11 Antikörper.....	31
2.1.12 Oligonukleotide	32
2.1.13 Organismen.....	33
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Arbeitstechniken	34
2.2.2 <i>In ovo</i> Mikroelektroporation.....	37
2.2.3 Virusinjektion	39
2.2.4 Genexpressionsanalyse	40
2.2.5 Gefrierschnitte	44

2.2.6	Vibratomschnitte.....	44
2.2.7	Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten	45
2.2.8	Biochemische Arbeitstechniken.....	45
2.2.9	Luziferase-Reporteranalysen	53
3.	ERGEBNISSE	55
3.1	Zeitliche und räumliche Expression von <i>Meis2</i> im anterioren Neuralrohr	55
3.2	Regulation der <i>Meis2</i>-Expression in der tektalen Anlage des Hühnchens	58
3.3	Funktion von <i>Meis2</i> bei der Entwicklung des Tectum opticums.....	61
3.3.1	<i>Meis2</i> ist an der Ausbildung früher tektaler Strukturen beteiligt.....	62
3.3.2	<i>Meis2</i> ist an der Ausbildung der tektumspezifischen Laminierung beteiligt	64
3.3.3	<i>Meis2</i> reguliert die Expression des tektalen Markergens <i>ephrinB1</i>	66
3.3.4	<i>Meis2</i> reguliert die Expression von <i>Dbx1</i> im Mittelhirn	72
3.3.5	<i>Meis2</i> induziert im Dienzephalon ein ektopisches Tektum	74
3.3.6	<i>Meis2</i> induziert kein ektopisches Tektum im Metenzephalon.....	78
3.3.7	Weitere Analysen zum Einfluss von <i>Meis2</i> auf das Zellschicksal im anterioren Neuralrohr	79
3.3.8	Die Induktion tektaler Strukturen durch <i>Meis2</i> erfolgt unabhängig von der positiven Rückkopplungsschleife des MHO	83
3.4	Identifizierung von <i>Meis2</i>-Interaktionspartnern im anterioren Neuralrohr	93
3.4.1	<i>Meis2</i> bildet in der tektalen Anlage des Hühnchens Komplexe mit <i>Otx2</i>	93
3.4.2	Die <i>Meis2</i> / <i>Otx2</i> -Interaktion ist DNA-unabhängig und wird über mehrere Peptidsequenzen des <i>Meis2</i> -Proteins vermittelt	96
3.4.3	Charakterisierung der Interaktionsdomäne von <i>Otx2</i>	98
3.4.4	Analysen zur funktionellen Relevanz der <i>Otx2</i> / <i>Meis2</i> -Interaktion	100
3.4.5	<i>Meis2</i> interagiert in der tektalen Anlage des Hühnchens mit <i>Pax3</i> und <i>Pax7</i>	109
3.4.6	<i>Meis2</i> kann in der Augenanlage mit <i>Pax6</i> interagieren	111
3.4.7	<i>Meis2</i> kann in der Augenanlage mit dem Enzym <i>Parp-1</i> interagieren.....	114
4.	DISKUSSION.....	116
4.1	<i>Meis2</i>-Expression kennzeichnet die Anlage des optischen Tektums.....	116
4.2	<i>Meis2</i> als Schlüsselprotein des tektalen Zellschicksals.....	119
4.3	<i>Meis2</i> als tektumspezifischer Ko-Faktor von <i>Otx2</i>.....	125
4.4	<i>Meis2</i> kann in der Augenanlage mit <i>Pax6</i> interagieren	136
4.5	<i>Meis2</i> kann in der Augenanlage mit dem Enzym <i>Parp-1</i> interagieren.....	138
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	140
	DANKSAGUNG	151
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	152
	LEBENS LAUF	153

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der frühen Regionalisierung des Neuralrohrs	2
Abbildung 2:	Tektumwachstum im Hühnchen	3
Abbildung 3:	Entwicklung der tektumspezifischen Laminierung im Hühnchen	4
Abbildung 4:	Genexpression an der Mittel-Hinterhirn Grenze	7
Abbildung 5:	Das regulatorische Netzwerk des Mittel-Hinterhirn Organisators	10
Abbildung 6:	Inaktivierung des <i>Otx2</i> -Gens führt zum Verlust anteriorer Hirnstrukturen	14
Abbildung 7:	Expression von Hox-Genen im frühen Neuralrohr	18
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der <i>in ovo</i> Mikroelektroporationstechnik	38
Abbildung 9:	Zeitliche und räumliche Expression von <i>Meis2</i> im anterioren Neuralrohr des Hühnchens und der Maus	57
Abbildung 10:	Regulation der <i>Meis2</i> -Expression im Mittelhirn des Hühnchens	60
Abbildung 11:	Dominant negativ wirkendes <i>Meis2EnR</i> stört die Axonfaszikulierung des MLF und LLF im HH 15 Mittelhirn	63
Abbildung 12:	Überexpression von <i>Meis2EnR</i> stört die Entwicklung der tektumspezifi- schen Laminierung	65
Abbildung 13:	Überexpression von <i>Meis2EnR</i> führt zur Unterdrückung des tektalen Gens <i>ephrinB1</i>	67
Abbildung 14:	Der Einfluss der Homeo- und der MEINOX-Domäne von <i>Meis2</i> auf die Regulation von <i>ephrinB1</i> im Mittelhirn	69
Abbildung 15:	Fehlexpression von <i>Meis2</i> im Dienzephalon induziert <i>ephrinB1</i> - Expression	71
Abbildung 16:	Fehlexpression von <i>Meis2</i> im Metenzephalon induziert keine <i>ephrinB1</i> - Expression	72
Abbildung 17:	Fehlexpression von <i>Meis2EnR</i> führt zur Unterdrückung von <i>Dbx1</i> im Mittelhirn	73
Abbildung 18:	Fehlexpression von <i>Meis2</i> im Dienzephalon induziert ektopische tektale Strukturen	75
Abbildung 19:	Ektopische tektale Strukturen 11,5 Tage nach Fehlexpression von <i>Meis2HA</i> im Dienzephalon	77
Abbildung 20:	Fehlexpression von <i>Meis2</i> im Metenzephalon induziert keine ektopischen tektalen Strukturen	78
Abbildung 21:	Fehlexpression von <i>Meis2</i> im Dienzephalon unterdrückt <i>Pax6</i> , die Fehl- expression von <i>Meis2EnR</i> im Mittelhirn führt jedoch nicht zur Induktion von <i>Pax6</i>	80

Abbildung 22: Die Unterdrückung von <i>Meis2</i> -Funktion im Mittelhirn führt nicht zur Induktion von <i>cAhl</i> oder <i>Irx2</i>	81
Abbildung 23: Die Fehlexpression von <i>Meis2</i> im ventralen Mittelhirn verändert nicht die <i>Nkx6.1</i> -Expression.....	82
Abbildung 24: Die Fehlexpression von <i>Meis2EnR</i> im Mittelhirn hat keinen Einfluss auf die Expression der tektalen Gene <i>Pax2</i> , <i>En2</i> und <i>Wnt3a</i>	84
Abbildung 25: Die Fehlexpression von <i>Meis2</i> im Dienzephalon führt nicht zur Induktion der MHO-assoziierten Gene <i>En1</i> , <i>Pax2</i> und <i>Fgf8</i>	86
Abbildung 26: Keine Induktion von <i>Pax3</i> und <i>Pax7</i> nach Fehlexpression von <i>Meis2HA</i> im Dienzephalon und keine Induktion von <i>Meis2</i> nach Fehlexpression von <i>Pax3HA</i> oder <i>Pax7HA</i>	87
Abbildung 27: Keine Induktion von <i>Fgf8</i> 24 h nach Fehlexpression von <i>Meis2HA</i> im Dienzephalon.....	89
Abbildung 28: Keine Induktion von <i>Fgf8</i> , <i>Pax2</i> oder <i>Wnt1</i> 48 h nach Fehlexpression von <i>Meis2HA</i> im Dienzephalon.....	90
Abbildung 29: Keine Induktion von <i>Fgf8</i> und <i>Wnt1</i> 72 h und 96 h nach Fehlexpression von <i>Meis2HA</i> im Dienzephalon.....	92
Abbildung 30: <i>Meis2</i> bildet <i>in vivo</i> Komplexe mit <i>Otx2</i> in der tektalen Anlage des Hühnchens.....	95
Abbildung 31: Die Interaktion von <i>Meis2</i> und <i>Otx2</i> ist DNA-unabhängig und wird über mehrere Peptidsequenzen von <i>Meis2</i> vermittelt.....	97
Abbildung 32: Die Interaktion von <i>Meis2</i> und <i>Otx2</i> ist direkt und wird über 18 As am N-terminus der Homeodomäne von <i>Otx2</i> vermittelt	99
Abbildung 33: <i>Meis2EnR</i> stört die <i>Otx2</i> -vermittelte Entwicklung eines ektopischen Tektums im Metenzephalon.....	102
Abbildung 34: Die Fehlexpression von <i>Otx2Δ1-53</i> im Metenzephalon führt weder zur Entwicklung ektopischer Tekta noch zur Induktion von <i>Meis2</i>	103
Abbildung 35: <i>Meis2</i> interagiert <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> in der tektalen Anlage des Hühnchens Mit <i>Pax3</i> und <i>Pax7</i>	110
Abbildung 36: <i>Meis2</i> kann in Augenanlagen des Hühnchens mit <i>Pax6</i> interagieren.....	113
Abbildung 37: Identifizierung von Parp-1 als möglichen Interaktionspartner von <i>Meis2</i> in E 2.5 Augenanlagen.....	114
Abbildung 37: Nukleäre und zytoplasmatische Expression des Enzyms Parp-1 in den Augenanlagen und im Mittelhirn des Hühnchens bei E 2.5.....	115
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Regulation der <i>Meis2</i> -Expression im Mittelhirn.....	118
Abbildung 39: Vergleich der wildtypischen Expression von <i>Otx2</i> und <i>Meis2</i> bei HH 15.....	126

Abbildung 40: Modelle zur möglichen Funktionsweise von Meis2 bei der Entwicklung des optischen Tektums.....	133
--	-----

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Meis2 erhöht nicht die Transaktivierungsaktivität von Otx2.....	105
Diagramm 2: Meis2 kann <i>in vitro</i> einer Grg4/Tle4-vermittelten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von Otx2 entgegenwirken.....	106
Diagramm 3: Meis2 kann bei Deletion der ersten 100 As von Otx2 einer Grg4/Tle4-vermittelten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von Otx2 nicht entgegenwirken.....	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hilfsmittel.....	20
Tabelle 2: Spezielle Chemikalien.....	22
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für molekularbiologische Arbeiten...	24
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für biochemische Arbeiten.....	25
Tabelle 5: Für die Herstellung unterschiedlicher DNA-Konstrukte verwendete Vektoren.....	27
Tabelle 6: Plasmide, die als DNA-Matrizen für <i>in vitro</i> Transkriptionen zur Herstellung von RNA-Sonden verwendet wurden.....	27
Tabelle 7: Expressionskonstrukte für die Elektroporation.....	28
Tabelle 8: Expressionskonstrukte für Reporteranalysen.....	29
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete RCAS-Viren.....	30
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete GST-Fusionskonstrukte.....	30
Tabelle 11: DNA-Konstrukte für die <i>in vitro</i> Transkription/Translation.....	30
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper.....	31
Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper.....	31
Tabelle 14: Oligonukleotide für die Amplifikation der DNA-Konstrukte, zur Herstellung der RNA-Sonden und für Klonierungen.....	32
Tabelle 15: Spezifische Oligonukleotide, welche für die Herstellung verschiedener DNA-Konstrukte verwendet wurden.....	32

Abkürzungsverzeichnis

As	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
bidest.	doppelt destilliert
bHLH	basic Helix-Loop-Helix (engl.) – basische Helix-Schleife-Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin (engl.) – Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA (engl.)- komplementäre DNS
DAB	3 – 3' – Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Di	Dienzephalon; Zwischenhirn
Dig	Digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid (engl.) – Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ephrin	Eph receptor interacting proteins
efnb1	ephrinB1
En	Engrailed
engl.	englisch
FITC	Floureszein-Isothiocyanat
et al.	et alii (lat.) – und andere
GFP	grün floureszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
Grg4/Tle4	Groucho/transducin-like Enhancer of split 4
h	Stunde(n)
HA	Influenza Hämagglutinin
HD	Homeodomäne

HH	Entwicklungsstadium nach Hamburger-Hamilton
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropyl- β -D thiogalactopyranosid
In	Input (engl.) – Einsatz, eingesetzte Menge Zelllysate
IP	Eluat der Immunopräzipitation
Kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
Ko-IP	Ko-Immunopräzipitation
LB	Luria-Bertani
LLF	laterale longitudinale Faszikel
Meis	myeloid ectopic integration site
Mes	Mesenzephalon; Mittelhirn
Met	Metenzephalon; Hinterhirn
μ	Mikro
m	Milli
MHO	Mittel-Hinterhirn Organisator
MHR	Mittel-Hinterhirn Region
min	Minute(n)
MLF	mediale longitudinale Faszikel
mRNA	messenger RNA (engl.) – Boten-Ribonukleinsäure
M	Molar
n	Stichprobenumfang
NBT	4-Nitro blue tetrazoliumchloride
NT	Nukleosid
N-terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
Otx2	orthodenticle homeobox 2
Pax	paired box
Parp-1	Poly-(ADP)-Ribose Polymerase I
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl.) – Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphat Buffered Saline (engl.) – Phosphat gepufferte Salzlösung
PD	Pull-Down (engl.) – Runterziehen
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii (lat.) – Kraft des Wassers
RCAS	Replication Competent ASLV with Splice acceptor site
RNA	ribonucleic acid (engl.) – Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute (engl.) – Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
sek	Sekunde(n)
Shh	Sonic Hedgehog
SK	Sepharose Kügelchen
St.	Stadium
Tab.	Tabelle
TALE	three amino acid loop extension
TBS	tris buffered saline (engl.) – Tris gepufferte Salzlösung
U	unit (engl.); Einheit der Enzymaktivität
Üb	Überstand
W	letzter Waschschrift
WB	„Western Blot“
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt. Aminosäuren wurden mit dem International gebräuchlichen Ein- bzw. Dreibuchstabencode abgekürzt.

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle des Transkriptionsfaktors *Meis2* als Ko-Faktor in der Entwicklung des anterioren Neuralrohrs untersucht. Hierbei gaben funktionelle Untersuchungen durch Fehl- und Überexpressionsstudien mittels *in ovo* Mikroelektroporation im Hühnchenembryo, Aufschluss über eine besondere Rolle von *Meis2* bei der Spezifizierung und Entwicklung des Tectum opticums. Überdies führten biochemische Untersuchungen zur Identifizierung neuer, bislang noch nicht beschriebener Interaktionspartner von *Meis2* im sich entwickelnden optischen Tektum und in den Anlagen der Augen. Diese Untersuchungen geben einen weiteren Einblick in die Funktionsweise von *Meis2* als Ko-Transkriptionsfaktor. Zusammengefasst lieferten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit folgende Erkenntnisse:

- I) Im Mittelhirn ist *Meis2*-Expression unter den bislang beschriebenen Regulatoren der Mittelhirnentwicklung einzigartig: es ist von Beginn an nicht dynamisch und kennzeichnet ausschließlich die dorsalen Alarplatten des Mittelhirns, den Bereich des zukünftigen optischen Tektums (Kapitel 3.1). Diese Expression unterliegt einer strikten negativen Regulation durch sezernierte Moleküle und Transkriptionsfaktoren der benachbarten Regionen des Neuralrohrs (Kapitel 3.2).
- II) *Meis2* ist für tektale Entwicklung erforderlich: Die Überexpression des dominant negativ wirkenden Konstruktes *Meis2EnR* störte die Entwicklung tektumspezifischer Strukturen sowohl in der frühen als auch in der späteren Entwicklung (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Zudem kam es zur Unterdrückung der tektalen Gene *ephrinB1* und *Dbx1* (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4).
- III) *Meis2* ist für tektale Entwicklung ausreichend: Die Fehlexpression von *Meis2* führte zur Induktion und Entwicklung ektopischer tektaler Strukturen im Dienzephalon (Kapitel 3.3.5). Dabei führte *Meis2* bereits 24 h nach Fehlexpression zur Transdifferenzierung des dienzephalischen in mesenzephalisches Zellschicksal, veränderte jedoch nicht das Schicksal des metenzephalischen Gewebes (Kapitel 3.3.7).
- IV) Bei der Induktion tektaler Strukturen ist *Meis2* nicht Bestandteil des regulatorischen Netzwerks des Mittel-Hinterhirn Organisators (MHO), eines sekundären Organisators, welcher die Entwicklung der Mittel-Hinterhirn Region steuert (Kapitel 3.3.8).
- V) *Meis2* bildet jedoch im Mittelhirn *in vivo* Komplexe mit *Otx2*, einem Schlüsselmolekül zur Spezifizierung des anterioren Neuralrohrs (Kapitel 3.4.1 – 3.4.3).

VI) Meis2 kann *in vitro* durch Bindung an Otx2 einer Grg4/Tle4-vermittelten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von Otx2 entgegenwirken (Kapitel 3.4.4). Otx2 kann, wie bereits in Arbeiten anderer Labors beschrieben, kontext-abhängig entweder als transkriptioneller Repressor oder Aktivator wirken. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen daher einen möglichen molekularen Mechanismus auf, wie durch zeitlich und räumlich kontrollierte Bindung eines Ko-Aktivators an Otx2 dessen transkriptionelle Aktivität wieder hergestellt werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben zum ersten Mal einen Transkriptionsfaktor, der unabhängig vom regulatorischen Netzwerk des MHO, die Entwicklung des optischen Tektums induziert. Sie liefern somit ein neuartiges mögliches Modell zur Spezifizierung anteriorer Hirnstrukturen: Die Induktion tektaler Entwicklung erfolgt nach Etablierung der Mittel-Hinterhirn Region durch Meis2, einem tektumspezifischen Ko-Faktor von Otx2.

VII) Meis2 bildet, im sich entwickelnden Mittelhirn, auch Komplexe mit den beiden Regulatoren der Tektumentwicklung Pax3 und Pax7 (Kapitel 3.4.5).

VIII) Außerdem konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere mögliche Interaktionspartner von Meis2 in den Anlagen der Augen identifiziert werden: Pax6, einem „*master control gene*“ der Augenentwicklung (Kapitel 3.4.6) und das Enzym Parp-1 (Kapitel 3.4.7), einem weit verbreiteten und vielseitigen Regulator der Genexpression.

Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf weitere wichtige Funktionen des Ko-Transkriptionsfaktors Meis2 in der Entwicklung des anterioren Zentralnervensystems.

1. Einleitung

1.1 Die Entwicklung des zentralen Nervensystems von Vertebraten

Die Entwicklung des Nervensystems beginnt gegen Ende der Gastrulation mit der Entstehung der Chorda dorsalis, auch Notochord genannt. Der Notochord ist eine zylindrisch angeordnete Gruppe von Zellen des Mesoderms, die sich entlang des gesamten Embryos erstreckt und die rostro-caudale (anterior-posteriore) Orientierung des Embryos festlegt. Über Signale des Notochord im direkt darüber liegenden Ektoderm werden die Zellen der Neuralplatte induziert. Diese Zellen verdicken sich und bilden die so genannte Neuralgrube, welche schließlich durch Einstülpungen und Schließen zur Bildung eines einfachen, linearen Neuralrohrs im Embryo führt. Das Neuralrohr ist der Ursprung des zentralen Nervensystems aller Vertebraten. Das anfangs lineare Neuralrohr wird im Laufe der weiteren Entwicklung schrittweise in verschiedene Regionen unterteilt. Diese Regionen bilden wiederum die Ursprünge der vielen, im adulten Organismus hoch spezialisierten Strukturen des Gehirns.

Die ersten morphologischen Anzeichen einer Regionalisierung werden bereits wenige Stunden nach Entstehung des Neuralrohrs anhand der Ausbildung mehrerer Hirnvesikel sichtbar. Hier kommt es zunächst zur Ausbildung von drei primären Vesikeln im anterioren Bereich des Neuralrohrs: Vorderhirn (Prosenzephalon), Mittelhirn (Mesenzecephalon) und Rautenhirn (Rhombenzecephalon). Im Hühnchenembryo werden die primären Vesikel im Hamburger-Hamilton (HH) Stadium 8 sichtbar (Hamburger und Hamilton, 1951). Als Folge weiterer Segmentierungsschritte entstehen zum einen aus dem Prosenzephalon das Endhirn (Telenzephalon) und das Zwischenhirn (Dienzecephalon). Zum anderen gliedert sich das Rhombenzecephalon in das Hinterhirn (Metenzecephalon, Rhombomer 1) und das Nachhirn (Rhombomere 2 – 7). Das Myenzecephalon bildet den Übergang vom Gehirn zum Rückenmark. Das Mesenzecephalon teilt sich nicht weiter auf. Im Neuralrohr sind somit fünf klar abgegrenzte Vesikel entstanden, welche das Grundgerüst des zukünftigen Gehirns bilden (im Hühnchen HH 10-11; Abb. 1). Aus dem Endhirn gehen der Kortex, die Riechkolben und der Hippocampus hervor. Aus dem Dienzecephalon stülpen sich einerseits lateral die optischen Vesikel aus, welches die Anlagen der neuralen Retinae sind. Andererseits entstehen hier die wichtigen Hormonzentren des Gehirns, der Hypothalamus und der Thalamus. Das Mittelhirn ist ein wichtiges Zentrum senso-motorischer Integration und das Hinterhirn der Ursprung des Zerebellums

(Kleinhirn). Im Myelencephalon liegen die wichtigsten vegetativen Schaltzentren, das Atem- und das Kreislaufzentrum.

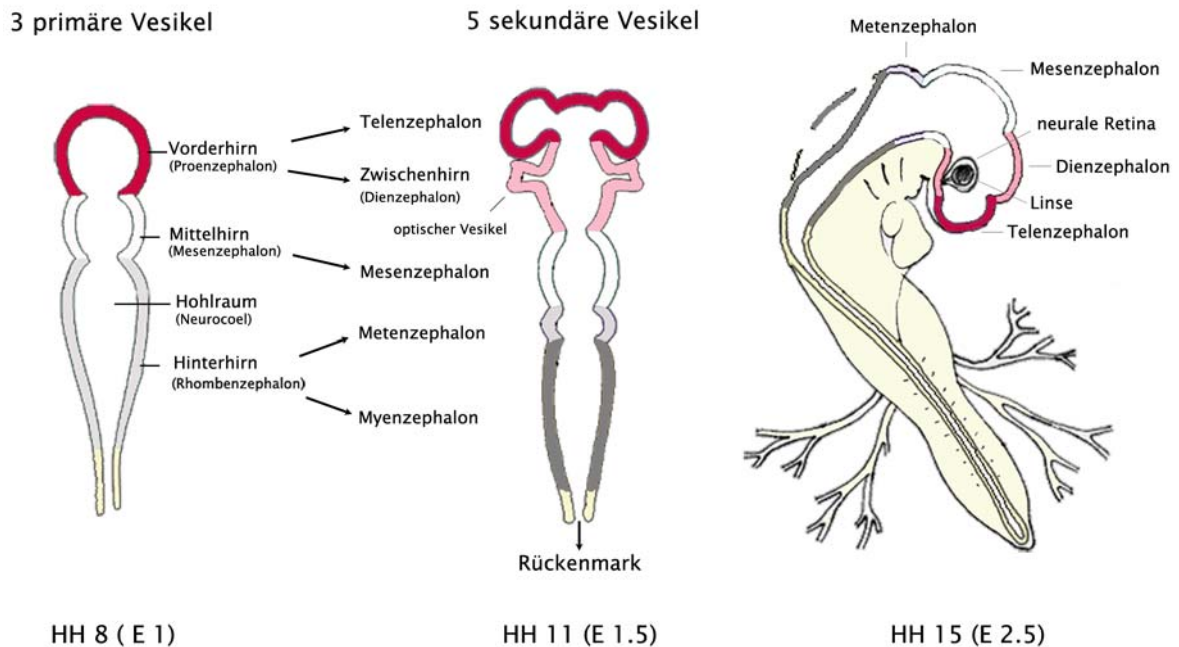


Abbildung 1: Schematische Darstellung der frühen Regionalisierung des Neuralrohrs. Zunächst entstehen drei primäre Vesikel. Das Vorderhirn und das Hinterhirn teilen sich weiter auf, während sich das Mittelhirn nicht aufteilt. Im Stadium HH 11 sind somit 5 sekundäre Vesikel entstanden, welche die Ursprünge der verschiedenen Hirnregionen des Organismus sind. Laterale Ausstülpungen des Diencephalons bilden die Anlagen der neuralen Retinae. Das Mesencephalon ist die Anlage des optischen Tektums. (Modifiziert nach Quelle: <http://www.uoguelph.ca/zoology/devobio/210labs/neuraldev11.html>)

1.2 Aufbau und Funktion des Tectum opticums

Das Tektum (Dach) des dorsalen Mittelhirns ist bei allen Vertebraten eine zentrale Station optischer und akustischer Informationsverarbeitung. Hier laufen Orientierungsinformationen aus unterschiedlichen Sinnessystemen zusammen und werden senso-motorisch integriert. Die senso-motorische Integration im Tektum dient der räumlichen Orientierung der meisten Vertebraten. Dafür werden hier die unterschiedlichen Sinne, wie der Sehsinn oder der Hörsinn, in so genannten topographischen Karten repräsentiert. Der Sehsinn, bei vielen Vertebraten das wichtigste Sinnessystem für die räumliche Orientierung, wird im optischen Tektum über die retinotop Karte repräsentiert. Über diese retinotektale Projektion erhält das optische Tektum von nicht-säugetenden Vertebraten bzw. der Colliculus Superior der Säuger direkte Eingänge aus der Retina. Hierbei erhalten benachbarte

tektale Zellen Signale von benachbarten retinalen Ganglienzellaxonen, so dass im optischen Tektum eine räumliche Abbildung der retinalen Information entsteht.

Die Entwicklung des optischen Tektums beginnt mit Ausdifferenzierung des Mesenzephalons im frühen Neuralrohr des Embryos. Das Mesenzephalon ist entlang seiner dorso-ventralen Achse bereits am embryonalen Tag (E) 1,5 in zwei Hauptbereiche regionalisiert: den dorsalen Alarplatten und den ventral gelegenen Basalplatten (Abb. 2). Während aus den Basalplatten durch Zelldifferenzierung das Tegmentum hervorgeht, entwickeln sich aus den beiden Alarplatten des dorsalen Mittelhirns die paarig angelegten optischen Tekta. Signalmoleküle der Dachplatte und der Bodenplatte spielen hierbei eine wichtige Rolle (Abb. 2). Erste morphologische Anzeichen der Tektumentwicklung sind bereits ab E 2 (HH 13) durch eine Vergrößerung der beiden Alarplatten im weiteren Verlauf der Entwicklung zu erkennen. Dieses Wachstum ist auf eine massive Zellproliferation in diesen Bereichen zurückzuführen, welche ihren Höhepunkt zwischen E 3 und E 6 hat und zusammen mit dem Absenken der Dachplatte zur Bildung von zwei, bei Vögeln sehr prominenten, optischen Tekta führt (Mey und Thanos, 2000).

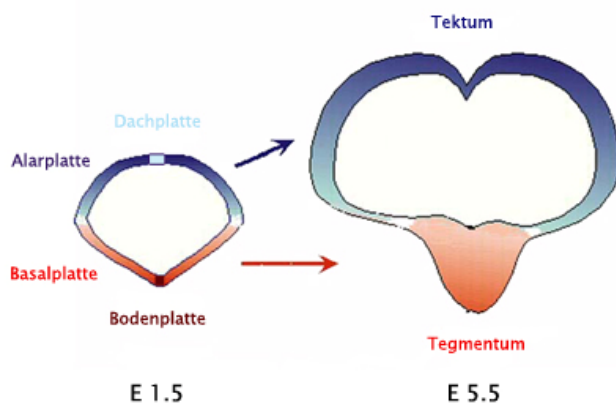


Abbildung 2: Tektumwachstum im Hühnchen. Die Abbildung zeigt Querschnitte durch das Neuralrohr bei E 1,5 und bei E 5,5. Das paarig angelegte Tektum entsteht aus den dorsalen Alarplatten des Mesenzephalons. Die ventral gelegenen Basalplatten des Mesenzephalons bilden das Tegmentum. Zwischen E 1,5 und E 5,5 entstehen durch massive Zellproliferation die beiden optischen Tekta. (modifiziert nach Watanabe und Nakamura, 2000)

Nach Stadium HH 21 (E 3.5) differenziert das tektale Neuroepithelium zu einer generativen Zone bestehend aus den eng zusammen gelegenen Somata der proliferierenden Vorläuferzellen, der Matrixzone und einer marginalen Zone aus peripheren Fasern und radialen Zellfortsätzen (Abb. 3C). Ab der zweiten Entwicklungswoche entsteht eine tektumspezifische Laminierung, indem eine große Anzahl an differenzierten Zellen vom Neuroepithel vertikal in Richtung der Oberflächenschicht wandert. Während dieser Periode kommt es mit drei aufeinander folgenden Migrationswellen zu einer enormen Verdickung des tektalen Gewebes von ca. 200 μm (E 6) auf einen Durchmesser von 1 mm (E 14) und

zur Ausbildung von insgesamt 15 Schichten im Tektum (Abb. 3). Die Nervenfasern der retinalen Ganglienzellaxone, die das Tektum ab E 6 innervieren, bilden hierbei die äußerste Schicht, das *Stratum opticum* (SO). Nach innen folgt das *Stratum griseum et fibrosum superficiale* (SGFS), bestehend aus fünf zellulären (a, c, e, g, i) und fünf plexiformen Schichten (b, d, f, h, j). Darauf folgt das *Stratum griseum centrale* (SGC) und das *Stratum album centrale* (SAC). Die beiden am Ependym gelegenen Schichten *Stratum griseum periventriculare* (SGP) und das *Stratum fibrosum periventriculare* (SFP), welche jedoch auf das dorsale und laterale Tektum beschränkt sind, bilden den Abschluss. Alternativ werden die Laminae von oben abwärts als Schichten 1 – 15 bezeichnet (Abb. 3f, Mey und Thanos, 2000). Die Entwicklung der tektalen Laminierung ist ab E 16 abgeschlossen. Die zytoarchitektonische Differenzierung ist, zumindest im Huhn, zum Zeitpunkt des Schlüpfens beendet (Mey und Thanos, 2000). Während der Entwicklung, werden die entstehenden Laminae von unten beginnend aufwärts gezählt und numerisch bezeichnet (LaVail und Cowen, 1971).

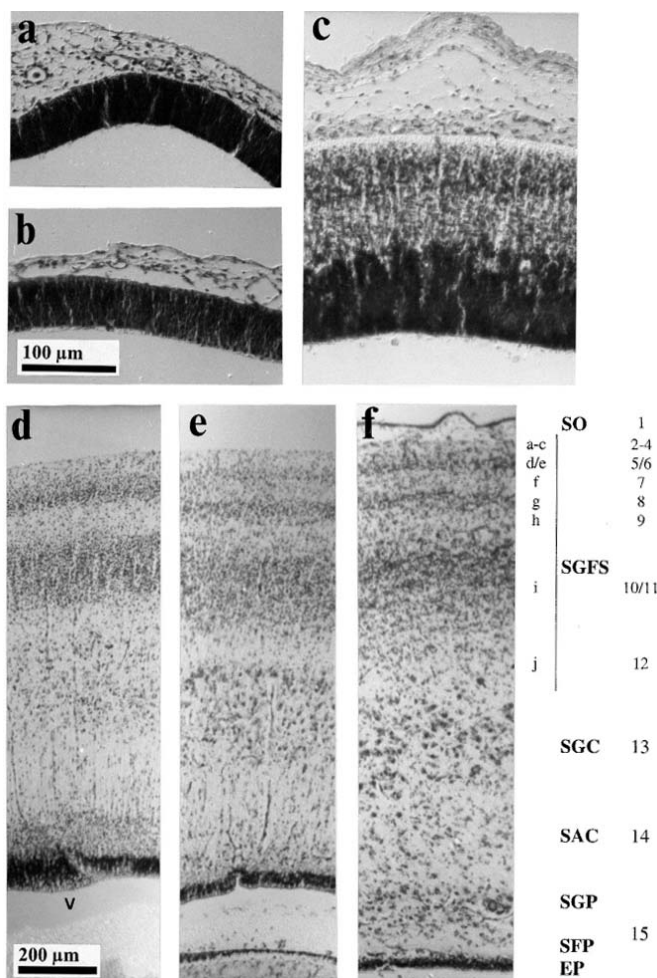


Abbildung 3: Entwicklung der tektum-spezifischen Laminierung im Hühnchen. Nissl-Färbung an Querschnitten des optischen Tektums bei (a) E 3 (HH 19); (b) E 4; (c) E 7; (d) E 12; (e) E 16 und (f) E 18. (Aus Mey und Thanos, 2000).

1.3 Die Entwicklung des Mittelhirns

Die Bildung bestimmter neuronaler Vorläuferzellen in definierten Positionen des Neuroepithels ist für die Entwicklung der unzähligen, in spezifischen Mustern angeordneten, und aus verschiedenen Zelltypen bestehenden Netzwerke des Nervensystems und ihren Verknüpfungen essentiell. Die Regionalisierung des Neuroepithels erfolgt bereits gegen Ende der Gastrulation mit der Festlegung einer anterior-posterioren und einer dorso-ventralen Achse, was den neuronalen Vorläuferzellen des Neuroepithels eine positionelle Identität verleiht. Diese Spezifizierung geht mit lokalen Signalen einher, die zunächst den anliegenden Geweben entstammen und später ebenfalls vom Neuroepithel selbst ausgesendet werden. Dabei wird das Neuroepithel in verschiedene Kompartimente aufgeteilt, was sowohl morphologisch durch Ausbildung der Hirnvesikel, als auch durch die Induktion von Transkriptionsfaktoren, die sich durch spezifische zeitlich-räumliche Expressionsmuster auszeichnen, erkennbar wird. Die Regionalisierung des Neuralrohrs entlang der dorso-ventral Achse wird hauptsächlich über die Signalwirkung der dorsalen Dachplatte und der ventralen Bodenplatte gesteuert, die ihren Einfluss auf das Neuroepithel durch das Sezernieren von Proteinen der Familie der *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) bzw. *Sonic Hedgehog* (Shh) ausüben (Wilson und Maden, 2005).

Im Neuroepithel entstehen im Verlauf der weiteren Entwicklung lokale Signalzentren, so genannte sekundäre Organisatoren, die eine weitere Differenzierung des benachbarten Gewebes entlang seiner anterior-posterioren Achse ermöglichen. Bisher wurden zwei lokale Signalzentren beschrieben: zum einen bildet eine Gruppe von Zellen am rostralen Ende des Vorderhirns die anteriore Neuralfurche („*anterior neural ridge*“), welche an der Entwicklung des Vorderhirns beteiligt ist. Zum anderen ist der so genannte Mittel-Hinterhirn Organisator (MHO) maßgeblich an der Entwicklung der Mittel-Hinterhirn Region (MHR) beteiligt.

1.3.1 Die Mittel-Hinterhirn Grenze als Organisator der Mittel-Hinterhirn Region

Die organisatorische Aktivität der MHR wurde durch Transplantationsexperimente an Vogelembryonen im 10-Somitenstadium entdeckt. Bei Transplantation des Gewebes aus der Einschnürung zwischen dem Mittel- und Hinterhirn (Isthmus) in die kaudale Vorder-

hirnregion, kam es zur Schicksalsänderung des Empfängerorgans. Es entwickelten sich tectumspezifische Strukturen mit einer invertierten Polarität (Martinez und Alvarado-Mallart, 1990; Nakamura et al., 1994). Bei Transplantation des gleichen Gewebes in die Anlage des Hinterhirns kam es zur Induktion eines zweiten Kleinhirns (Martinez et al., 1995). Diese und weitere Transplantationsexperimente brachten zwei bedeutende Erkenntnisse. Zum einen ist das Neuroepithel in bestimmten Bereichen des Neuralrohrs zum Zeitpunkt der Transplantationen, also zwischen dem 10 – 14 Somitenstadium, durch eine grobe Regionalisierung des Gewebes zwar bereits prädestiniert, jedoch noch nicht festgelegt. Das Schicksal des Gewebes kann also bis zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung noch verändert werden. Zum anderen besitzt der Isthmus, abhängig vom Empfängerorgane, die Fähigkeit lokal tectumspezifische bzw. hinterhirnspezifische Strukturen zu induzieren, was wichtige organisatorische Funktionen dieses Gewebes im Bezug auf die Mittel- und Hinterhirnregionen aufzeigte. Das Entfernen der isthmischen Einschnürung führte zu einem Verlust der gesamten Mittel-Hinterhirn Region (Wurst und Bally-Cuif, 2001). Die Bedeutung des Isthmus für die Musterbildung des Neuralrohrs konnte ebenfalls an Versuchen mit Mäusen und Zebrafischen gezeigt werden. Der Isthmus ist also generell für die Entwicklung der MHR bei Vertebraten verantwortlich (Miyagawa et al., 1996; Camus et al., 2000).

1.3.2 Entstehung und Funktion des Mittel-Hinterhirn Organisators

Zunächst spielen bei der Festlegung einer anterior-posterioren Identität die beiden Proteine *Otx2* („*orthodenticle homeobox 2*“) und *Gbx2* („*gastrulation brain homeobox 2*“), zwei Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Homeodomänenproteine, eine wichtige Rolle. Signale aus dem anterioren extraembryonischen Gewebe und wenig später aus dem anterioren Endoderm induzieren die Expression von *Otx2* im anterioren Bereich des zukünftigen Nervensystems. *Gbx2* hingegen wird im posterioren Bereich des Neuralrohrs exprimiert (Abb. 4a, A). Untersuchungen zeigten, dass die Grenze zwischen den Expressionsdomänen dieser Transkriptionsfaktoren der Position des MHO und somit der Position des zukünftigen Mittelhirns und Hinterhirns entspricht (Broccoli et al., 1999; Millet et al., 1999; Joyner et al., 2000). Parallel zur Festlegung der Mittel-Hinterhirn Grenze wird sequentiell die Expression weiterer regulatorischer Faktoren der Mittel- und Hinterhirnentwicklung induziert. Zunächst beginnt die Expression der Transkriptionsfaktoren *paired box 2* (*Pax2*) und *engrailed 1* (*En1*) sowie des sezernierten Glykoproteins

Wnt-1. Ein wenig später folgt die Induktion des Homeodomänenproteins *engrailed 2* (*En2*), des Transkriptionsfaktors *paired box 5* (*Pax5*) und des sezernierten Moleküls *fibroblast growth factor 8* (*Fgf8*).

Alle genannten Gene werden zunächst weitläufig im Bereich des Mesenzephalons und des Metenzephalons, in zum Teil überlappenden Domänen, exprimiert (Abb. 4b, B – H). Im Verlauf der weiteren Entwicklung werden diese Expressionsdomänen auf bestimmte Bereiche um die Mittel- und Hinterhirn Region beschränkt. Die Transkriptionsfaktoren *Pax2/5* und *En1/2* werden anterior und posterior des MHO in überlappenden Domänen exprimiert (Abb. 4c, D' – F'). Die Expression von *Wnt1* beschränkt sich auf einen schmalen Streifen entlang der dorsalen Mittellinie und einen transversalen Ring anterior zum MHO (Abb. 4c, G'). Die Expression von *Fgf8* beschränkt sich hingegen auf einen schmalen Streifen posterior der isthmischen Einschnürung (Abb. 4c, H'). Die Expressionsdomänen von *Wnt1* und *Fgf8* liegen somit am posterioren Ende der *Otx2*- bzw. am anterioren Ende der *Gbx2* Domäne und flankieren beidseitig die Mittel-Hinterhirn Grenze.

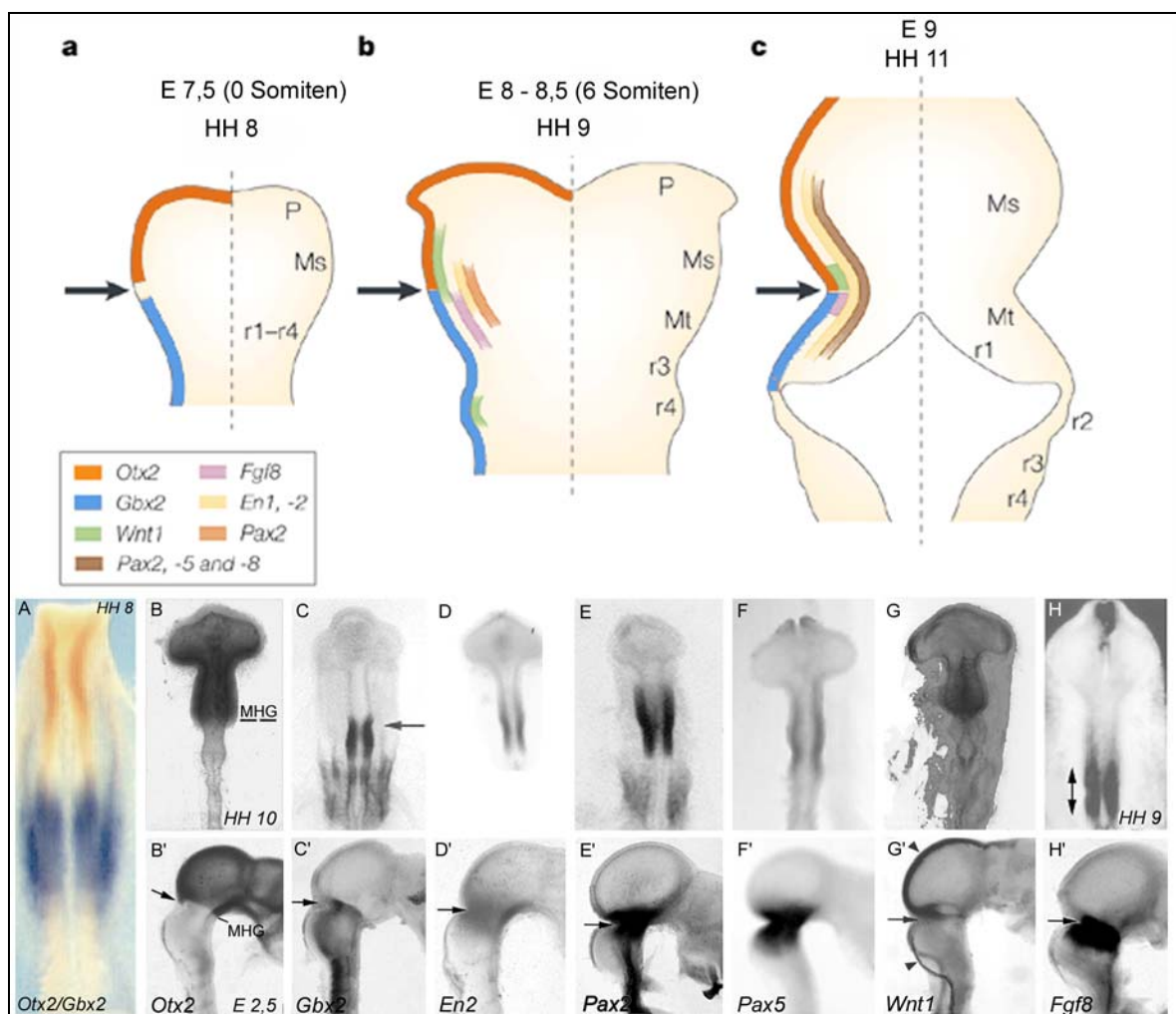


Abb. 4: Genexpression an der Mittel-Hinterhirn Grenze. Bildbeschreibung auf der nächsten Seite.

Abbildung 4: Genexpression an der Mittel-Hinterhirn Grenze. Schematische Darstellung der Genexpression der MHR von HH 8 (a); HH 9 (b) und HH 11 (c) Hühnchen. Das entsprechende Entwicklungsstadium in der Maus ist auch aufgeführt (aus Wurst und Bally-Cuif, 2001). (A) *In situ* Hybridisierung zeigt die Expression von *Otx2* (rot) und *Gbx2* (blau) im HH 8 Hühnchen. Expression von *Otx2* (B, B'), *Gbx2* (C, C'), *En2* (D, D'), *Pax2* (E, E'), *Pax5* (F, F'), *Wnt1* (G, G') und *Fgf8* (H, H') bei HH 9 – 10 (B – H) und bei E 2,5 (HH 15) (B' – H'). *Otx2*-Expression kennzeichnet das anteriore, *Gbx2* das posteriore Neuralrohr. Die frühe Expression der Gene ist weitläufig über das Metenzephalon und das Metenzephalon und überlappt. Im Verlauf der Entwicklung werden die einzelnen Expressionsdomänen und auf die Mittel- und Hinterhirn Region begrenzt. MHG: Mittel-Hinterhirn Grenze. (A, D, H aus Garda et al., 2001; B, B', C, C', E, E', D', G, G', H' aus Hidalgo-Sanchez et al., 2005; F, F' aus Funahashi et al., 1999).

Gezielte Geninaktivierungen in der Maus und natürlich vorkommende Mutationen beispielsweise im Zebrafisch zeigten, wie wichtig die Anwesenheit und die richtige Kombination der Expressionsmuster all dieser Genprodukte für die Entwicklung der MHR sind. Diese Genprodukte werden im Mittelhirn und im Hinterhirn exprimiert. Entsprechend ihrer Expressionsmuster führt der Verlust eines dieser Proteine also immer zu einer Entwicklungsstörung oder zu einem Verlust beider Hirnstrukturen (McMahon und Bradley, 1990; Wurst et al., 1994; Millen et al., 1994; Hanks et al., 1995; Danielian und McMahon, 1996; Brand et al., 1996; Urbanek et al., 1997; Schwarz et al., 1997; Meyers et al., 1998).

Die Bedeutung der hier beschriebenen Gene für die Entwicklung der MHR, konnte auch mit Hilfe von Fehlexpressionsstudien gezeigt werden. Die Fehlexpression eines dieser Gene führte im Dienzephalon stets zur Entstehung ektopischer tektaler Strukturen. Dies ließ sich morphologisch aber auch anhand der Induktion von normalerweise in der MHR exprimierten Genen erkennen. So führte die Fehlexpression des frühen MHR-Gens *Pax2* im Dienzephalon zur Entwicklung eines ektopischen Tektums und zur Induktion von *Fgf8*, *Pax5* und *En2* (Okafuji et al., 1999). *Pax5*-Fehlexpression führte ebenfalls zu ektopischen tektalen Strukturen und einer Induktion der Gene *Fgf8*, *En2* und *Wnt1* (Funahashi et al., 1999). Die Fehlexpression von *En2* hatte eine rostrale Verschiebung der di- mesenze- phalischen Grenze zur Folge und induzierte die Expression von *Fgf8*, *Wnt1*, *Pax2/5* und *ephrinA2* (Araki und Nakamura, 1999). *En1* induziert bei Fehlexpression im Dienzephalon die Expression von *Fgf8* (Shamim et al., 1999). Weiterhin konnten in das Dienzephalon transplantierte, *Wnt1* produzierende Zellen die Expression von *En2* hervorrufen (Bally-Cuif et al., 1992; Sugiyama et al., 1998). Somit kann jedes der in der MHR exprimierten Gene auch die Expression der anderen Gene induzieren. Wichtig ist jedoch, dass die Induktion tektaler Strukturen ausnahmslos mit einer Induktion von *Fgf8* einhergeht. Somit ist bisher nicht klar, ob die beschriebenen Induktionen direkt oder indirekt über die Signalwirkung von *Fgf8* stattfinden.

Die Entwicklung des MHO lässt sich also in zwei Phasen einteilen: die Etablierung des MHO gefolgt von dessen Aufrechterhaltung. Entscheidend für die Etablierungsphase ist die Expression von *Otx2* und *Gbx2*. Durch gegenseitige Hemmung entsteht eine Grenze zwischen den Expressionsdomänen dieser Transkriptionsfaktoren. Dieser Bereich legt die Position des MHO fest, woraufhin dort verschiedene, zum Großteil voneinander unabhängige Signalwege aktiviert werden. Es kommt zur Induktion von *Wnt1*, *Pax2*, *Fgf8* und der anderen an der Entwicklung des MHO beteiligten Faktoren. Im Laufe der darauf folgenden Aufrechterhaltungsphase wird die anfangs unabhängig voneinander induzierte Expression all dieser Faktoren voneinander abhängig. Die Expressionsdomänen der einzelnen Genprodukte werden geschärft, und sie werden allesamt Teil einer positiven Rückkopplungsschleife, in der jedes der involvierten Proteine einen positiven Einfluss auf die Expression der anderen hat (Abb. 5). So wird gewährleistet, dass die Expression der verschiedenen, für die Mittel- und Hinterhirnentwicklung benötigten, regulatorischen Faktoren erhalten bleibt und die Entwicklung des Mittel- und Hinterhirns vorangetrieben wird. Zusätzlich zur Festlegung der MHR sorgen hemmende Einflüsse zwischen dem diencephalischen Marker *Pax6* und *En1/2* zur Etablierung einer di-mesenzephalischen Grenze, welche die anteriore Grenze des Mittelhirns festlegt (Araki und Nakamura, 1999; Matsunaga et al., 2000).

Die an der Funktion und Stabilisierung der Mittel-Hinterhirn Grenze beteiligten Genprodukte induzieren ihre Expression untereinander. Diese positive Rückkopplung sollte theoretisch zu einer raschen, lateralen Ausbreitung der Expressionsdomänen dieser Proteine führen. Mehrere negative Rückkopplungsmechanismen wirken dieser Ausbreitung entlang der anterior-posterioren Achse jedoch entgegen. Dies ist vor allem für die Positionierung der *Fgf8*-Expressionsdomäne wichtig. Das zytoplasmatische Protein *Sprouty* wird dosisabhängig durch *Fgf8* induziert, greift hemmend in den dem *Fgf*-Rezeptor nachgeschalteten Ras-Map-Kinase Signalweg ein und hemmt die *Fgf8*-Expression (Minowada et al., 1999). *Pax2* induziert die Expression von *Fgf8*. Der Ko-Repressor *Grg4/Tle4* wird im Mesenzephalon exprimiert und interagiert mit Transkriptionsfaktoren wie z. Bsp. *Pax2* und *Otx2*. Dadurch wird die Expression von *Fgf8* anterior des MHO unterdrückt (Ye et al., 2001; Heimbucher et al., 2007). *Otx2* hat nicht-zellautonom einen positiven Einfluss auf die Expression von *Fgf8*, hemmt jedoch dessen Expression zellautonom. Die *Fgf8*-Expression wird dadurch also nur an der Grenze von *Otx2*⁺, jedoch nur in *Otx2*⁻ Zellen möglich, so dass die *Fgf8*-Expression auf den Bereich der isthmischen Einschnürung beschränkt wird (Ye et al., 2001). *Fgf8* selbst wiederum

hemmt die Expression von *Otx2*. Diese negativen Mechanismen zusammen mit den beschriebenen positiven Rückkopplungsmechanismen ermöglichen im Laufe der Entwicklung die Entstehung des MHO und der MHR. Dabei führt die Kombination all dieser Gene, die in der Mittel- und Hinterhirn Region exprimiert werden, zu einer Determinierung von Mittelhirncharakteristika und ermöglicht eine weitere Entwicklung des Tektums (Nakamura, 2001b).

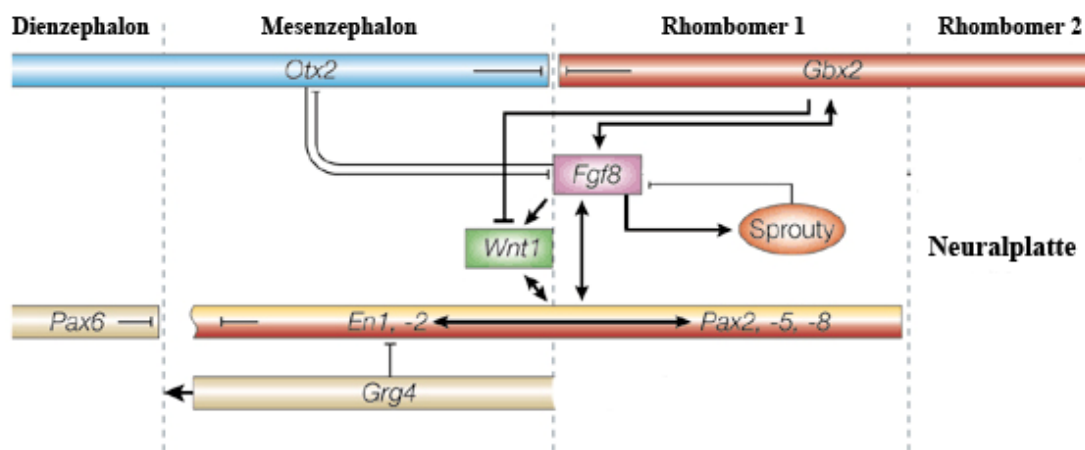


Abbildung 5: Das regulatorische Netzwerk des Mittel-Hinterhirn Organisators. *Otx2* und *Gbx2* üben einen hemmenden Einfluss aufeinander aus, was zur Festlegung der zukünftigen Mittel-Hinterhirn Grenze führt. Die Expression der MHO-Gene wird zunächst unabhängig voneinander sequentiell induziert. Im Laufe der Entstehung des MHO wird die Expression dieser Gene abhängig voneinander, so dass jedes Protein die Expression der anderen Gene aufrechterhält. Dadurch wird die Aktivität des MHO aufrechterhalten. Die Positionierung der *Fgf8*-Expression erfolgt durch negative Regulatoren wie z. Bsp. *Sprouty* und *Grg4*. Hemmende Interaktionen zwischen *En1/2*, *Pax2* und *Pax6* resultieren in der Entstehung einer dimesenzephalischen Grenze. (Modifiziert nach Wurst und Bally-Cuif, 2001).

Das spezifische Expressionsmuster von *En1/2* nimmt bei der Entwicklung des Mittelhirns eine besondere Rolle ein. Im Laufe der Positionierung und Etablierung der MHR sorgen die bereits beschriebenen, positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen für einen Gradienten der *En1/2*-Expression entlang der anterior-posterioren Achse des Mittelhirns, mit der stärksten Expression im posterioren Bereich. Wie mit Hilfe von Transplantationsexperimenten gezeigt werden konnte, schafft dieser Gradient die Grundlage einer Polarität im Mittelhirn. Diese Polarität wiederum spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der retinotektalen Projektion (Nakamura, 2001a). *En1/2* induziert die Expression der beiden Zelladhäsionsmoleküle *ephrinA2/A5*. Diese werden dadurch ebenfalls in einem posterior hoch zu anterior niedrigen Gradienten exprimiert (Logan et al., 1996). Die

spezifischen Expressionsgradienten der ephrinA2/A5-Moleküle auf tektalen Zellen lenken das Wachstum retinaler Ganglienzellaxone, die das optische Tektum innervieren und ermöglichen so die Entstehung einer korrekten anterior-posterioren retinotopen Karte (McLaughlin und O'Leary, 2005).

1.3.3 Fgf8 und die organisatorische Aktivität des MHO

Das sezernierte Molekül Fgf8 ist das Schlüsselmolekül für die organisatorische Aktivität des MHO. Zum einen ist die *Fgf8*-Expression, im Gegensatz zu allen anderen Genen der MHR, auf einen schmalen Streifen in der isthmischen Einschnürung, dem Bereich größter organisatorischer Aktivität des Gewebes beschränkt. Zum anderen konnte die Transplantation von Fgf8-getränkten Acrylkügelchen in das zukünftige Vorderhirn die Aktivität des MHO nachahmen und dort Gewebe mit mittelhirnspezifischen Charakteristika induzieren (Crossley et al., 1996; Martinez et al., 1999). Wurden die Kügelchen in weiter kaudal gelegene Bereiche wie das Di- oder Mesenzephalon implantiert, so entstand neben ektopischen tektalen Strukturen ebenfalls Gewebe mit Hinterhirncharakter (Martinez et al., 1999). Eine wichtige Erkenntnis dieser Untersuchungen war, dass die Aktivität von Fgf8 hierbei auf der Induktion einer ektopischen Mittel-Hinterhirn Grenze beruht: nach Transplantation der Fgf8-Kügelchen kommt es im Bereich der *Otx2*-positiven Domäne zur Induktion von *Gbx2*. Aufgrund einer dadurch und durch Fgf8 bedingten Unterdrückung von *Otx2* entsteht eine neue Grenze zwischen den Expressionsdomänen von *Otx2* und *Gbx2*, was zur Induktion von *Fgf8* in diesem Bereich führt (Martinez et al., 1999; Garda et al., 2001). Im Bereich des ektopischen MHOs kommt es ebenfalls zur Induktion von *Pax2/5*, *Wnt1* und *En1/2*. Diese Expressionsdomänen werden durch den Einfluss von Fgf8 und der positiven Rückkopplung der Faktoren untereinander aufrechterhalten, so dass die Entstehung ektopischer tektaler Strukturen möglich wird. Dieser Mechanismus spiegelt also die molekularen Prozesse in der Etablierung und der Aufrechterhaltung des MHOs wider. Die Expression von *Fgf8* beginnt erst nach Induktion von *Pax2*, *En1* und *Wnt1*. Die *Fgf8*-Domäne wird jedoch schnell, vor allen anderen Expressionsdomänen auf einen schmalen Streifen beschränkt.

Daher wird angenommen, dass der positive Einfluss von Fgf8 auf die Expression der Gene in der MHR nicht der Induktion der MHR dient, sondern der Positionierung und der Aufrechterhaltung der Expression dieser Gene (Reifers et al., 1998; Shamim et al., 1999).

1.4 Homeodomänenproteine und die Embryonalentwicklung

Die Homeodomäne (HD) ist eine 60 Aminosäure lange Proteindomäne, welche durch die Homeobox, einer hoch konservierten Gensequenz, kodiert wird. Sie ist in einer großen Anzahl unterschiedlicher Proteine, den Homeodomänenproteinen, zu finden. Vor etwa 80 Jahren erlaubten Untersuchungen an Mutationen, die in *Drosophila melanogaster* zu segmentalen Transformationen führten, so genannten homeotischen Mutationen, die Entdeckung und Isolierung einer großen Anzahl an Homeoboxgenen. Die starke Konservierung der Homeoboxsequenzen zwischen unterschiedlichen Genen aber auch zwischen den unterschiedlichen Spezies, angefangen bei der Hefe bis hin zum Menschen, führen zu der heutigen Annahme, dass alle Homeoboxgene von einem gemeinsamen Gen abstammen und durch Genduplikationen entstanden sind.

Homeodomänenproteine sind transkriptionelle Regulatoren, welche entweder als Aktivatoren oder Repressoren eukaryotischer Transkription fungieren. Dabei enthalten diese Transkriptionsfaktoren verschiedene funktionelle Domänen, welche beispielsweise der Bindung an die DNA, der Dimerisierung und der transkriptionellen Aktivierung bzw. Repression dienen. Die HD ist hauptsächlich für eine sequenzspezifische Bindung an die DNA verantwortlich. Dabei werden hoch konservierte DNA-Bindemotive in den regulatorischen Sequenzen der einzelnen Gene gebunden. Röntgenstrukturanalysen zeigten, dass die HD aus drei α -Helices besteht. Dabei ist Helix 3 durch Ausbildung der meisten Wasserstoffbrückenbindungen mit Nukleotiden der DNA-Kette die Erkennungshelix und trägt somit den größten Teil zur Bindung an die DNA bei. Durch eine für die HD typische, dreidimensionale Anordnung, bilden Helix 1 und 2 zusammen das so genannte Helix-Schleife-Helix-Motiv und stabilisieren die Helix 3-vermittelte Bindung an die DNA. Verschiedene HD-Proteine haben zusätzlich zur HD auch weitere konservierte Proteindomänen, die sowohl zur Bindung an die DNA als auch für die Funktion des Proteins, wie beispielsweise für die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen, benötigt werden. Untersuchungen zeigten, dass die Bindung der HD an ihre Erkennungssequenzen relativ unspezifisch ist. Dies war zunächst überraschend, da die Funktion der einzelnen HD-Proteine während der Embryonalentwicklung sehr spezifisch ist (Mann, 1995). Die Spezifität der DNA-Erkennung wird jedoch zum einen durch zusätzliche DNA-Bindedomänen und zum anderen durch die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglicht (Vershon, 1996). Diese Interaktionsdomänen können entweder homodimere Interaktionen aber auch heterodimere Interaktionen mit anderen nukleären regulatorischen Proteinen, wie

Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren, vermitteln. Sie ermöglichen so eine große Anzahl an Kombinationen der transkriptionellen Regulatoren. Die Interaktion verschiedener HD-Proteine mit Transkriptionsfaktoren, ermöglicht eine große kombinatorische Diversität zur Ausführung komplexer genetischer Programme, wie sie beispielsweise während der Embryonalentwicklung erforderlich sind.

1.4.1 Otx2 und die Festlegung anteriorer Hirnstrukturen

Otx2 (*orthodenticle homeobox 2*) und Otx1 (*orthodenticle homeobox 1*) wurden in Vertebraten als Homologe des *orthodenticle* Proteins aus *D. melanogaster* isoliert (Simeone et al., 1992). Wie *orthodenticle* gehören sie zur *bicoid* Subfamilie der HD Transkriptionsfaktoren. Die *Otx2*- Expression beginnt in der Embryonalentwicklung bereits vor Beginn der Gastrulation. *Otx2* wird zunächst im Epiblasten (embryonales Gewebe) und im viszelaren Endoderm (extraembryonales Gewebe) gefunden. Später exprimieren das anteriore viszelare Endoderm (AVE), sowie am Ende der Gastrulation das axiale Mesendoderm (AME) *Otx2* (Acampora et al., 2001).

Im Laufe der Entwicklung bleibt die *Otx2*-Expression im anterioren Neuralrohr erhalten und kennzeichnet dadurch ausschließlich den Bereich des Neuralrohrs, welcher der Ursprung anteriorer Hirnregionen ist. Die Inaktivierung beider *Otx2*-Allele führt zur embryonalen Letalität und resultiert, entsprechend des Expressionsmusters von *Otx2*, in einem kompletten Verlust anteriorer Hirnregionen. *Otx2*-Mutanten Mäusen fehlen Telenzephalon, Diencephalon und das Mesenzephalon. Die posterioren Strukturen des Embryos, das posteriore Metenzephalon und das Rückenmark entwickeln sich hingegen normal (Abb. 6; Acampora et al., 1995; Matsuo et al., 1995; Ang et al., 1996; Tian et al., 2002). Eine Nullmutation des Homologs *orthodenticle* in *D. melanogaster* führte ebenfalls zum Verlust anteriorer Kopfregionen, was auf eine evolutionäre Konservierung der Funktion dieses Proteins schließen lässt (Finkelstein und Perrimon, 1990).



Abbildung 6: Inaktivierung des *Otx2*-Gens führt zum Verlust anteriorer Hirnstrukturen. (A, B) Expression des anterioren Markergens *En* bei wildtypischen oder heterozygoten $Otx2^{+/-}$ -Mäusen (A) oder homozygoten $Otx2^{-/-}$ -Mäusen (B). Rechts ist jeweils schematisch das Neuralrohr E 8,5 dargestellt. Im wildtypischen ist in schwarz der Bereich von *Otx2*-Expression gekennzeichnet. Homozygoten $Otx2^{-/-}$ -Mäusen fehlen Telenzephalon, Diensephalon, Mesensephalon und Rhombomere 1 und 2. (Modifiziert nach Ang et al., 1996 und Hirth und Reichert, 1999)

Somit ist *Otx2*-Funktion, entsprechend der frühen und spezifischen Expression, für die Entstehung anteriorer Hirnstrukturen, wie Telenzephalon, Diensephalon und Mesensephalon unentbehrlich. Das anteriore Neuroektoderm wird also zunächst durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Otx2* festgelegt. Im Laufe der weiteren Entwicklung wird die Expressionsdomäne Schritt für Schritt in kleinere Kompartimente unterteilt, welche dann die unterschiedlichen Strukturen des anterioren Hirns bilden können.

Wie zahlreiche Untersuchungen zeigen konnten, ist *Otx2* sowohl für die Spezifizierung als auch für die Erhaltung anteriorer Hirnstrukturen essentiell (Acampora et al., 2001). So hat *Otx2* auch in späteren Aspekten der Festlegung und Entwicklung von Vorderhirn, Zwischenhirn und dem Mittelhirn wichtige Funktionen. *Otx2*-Expression wird auch noch lange nach Spezifizierung des anterioren Neuroektoderms und der Positionierung des MHO im Mittelhirn aufrechterhalten. Untersuchungen unter Anwendung verschiedener genetischer Strategien, die es erlaubten, das *Otx2*-Gen zu späteren Zeitpunkten zu inaktivieren, konnten zeigen, dass *Otx2* auch in späteren Aspekten der Entwicklung tektaler Strukturen wichtige Rollen einnimmt. So zeigte sich, dass die Inaktivierung von *Otx2* in neuronalen Vorläuferzellen selbst nach Ausbildung eines adäquaten MHO zur Entwicklung ektopischer zerebellarer Strukturen im Mittelhirn führte und die Differen-

zierung mittelhirnspezifischer, neuronaler Subtypen störende. Dabei spielt Otx2 zwischen E 10,5 und E 16,5 in der Maus eine entscheidende Rolle für die Entwicklung des Mittelhirns (Vernay et al., 2005; Fossat et al., 2006).

Aufgrund seines Expressionsmusters erfüllt Otx2 diese Funktionen stets in Kooperation mit anderen Faktoren die, im Gegensatz zu *Otx2*, in den entsprechenden Bereichen spezifische Expressionsmuster aufweisen. So werden Otx2 beispielsweise wichtige Funktionen in der Spezifizierung und Entwicklung von Augenstrukturen zugesprochen. Durch Interaktion mit Sox2 reguliert Otx2 dabei die Expression von *Rax* (*Rx*), einem wichtigen Protein der Augenentwicklung (Martinez-Morales et al., 2001; Danno et al., 2008). Untersuchungen weisen darauf hin, dass Otx2 durch die Interaktion mit eIF4 (*eukaryotic translation initiation factor 4E*), einem Protein der Translationsmaschinerie, womöglich eine wichtige Rolle bei der Regulation der Translation von Proteinen im Prosencephalon einnimmt (Nedelec et al., 2004). Im Dienzephalon kooperiert Otx2 mit Pax6, Emx2 und Otx1 in der Festlegung und Entwicklung spezifischer Strukturen (Kimura et al., 2005).

Sowohl bei der Positionierung des MHO, als auch bei der Festlegung und Differenzierung tektumspezifischer Neuronentypen, kann Otx2 wichtige Funktionen durch eine Interaktion mit dem Ko-Repressor Grg4/Tle4 ausüben. Eine direkte Bindung von Otx2 an Grg4/Tle4 führt dabei zu einer Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von Otx2. Auf diese Weise fungiert Otx2 kontextabhängig entweder als transkriptioneller Aktivator oder als transkriptioneller Repressor (Puelles et al., 2004; Heimbucher et al., 2007). Eine Kooperation, die eine Induktion tektumspezifischer Genexpression ermöglicht, wurde bislang jedoch noch nicht beschrieben.

1.4.2 Pax-Proteine

Pax (*paired box*) Gene kodieren für eine Familie von insgesamt neun Transkriptionsfaktoren, die durch die Anwesenheit einer 128 Aminosäuren langen, so genannten *Paired*-Domäne gekennzeichnet sind. Die *Paired*-Domäne dient der sequenzspezifischen Bindung an die DNA. Zusätzlich besitzen nahezu alle Pax-Proteine (mit Ausnahme von Pax4 und Pax6) ein so genanntes Oktapeptid, sowie eine partielle (Pax2, Pax5 und Pax8) oder eine komplette HD (Pax3, Pax4, Pax6 und Pax7). Pax1 und Pax9 besitzen nur eine *Paired*-Domäne. Auf Grundlage der Anwesenheit einiger oder aller dieser Elemente und von Sequenzhomologien innerhalb der *Paired*-Domänen werden vier Subfamilien von Pax-

Proteinen unterschieden: Pax1/Pax9, Pax2/Pax5/Pax8, Pax3/Pax7 und Pax4/Pax6. Das Oktapeptid ist eine hoch konservierte, aus acht Aminosäuren bestehende Domäne, die in der Proteinsequenz zwischen der *Paired*-Domäne und der HD liegt. Ihr werden aufgrund von Deletionsversuchen in Pax2/5/8, inhibitorische transkriptionelle Aktivitäten zugeschrieben. Es wurde zudem gezeigt, dass Pax5 durch eine Interaktion mit dem Ko-Repressor Grg4/Tle4, die durch das Oktapeptid vermittelt wird, die Transkription nachgeschalteter Gene unterdrücken kann (Eberhard et al., 2000).

Pax-Proteine werden in vielen neuronalen und auch nicht-neuronalen Geweben exprimiert und üben entsprechend ihrer Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung wie auch im adulten Organismus vielfältige Funktionen aus. Dies zeigen spontane oder gezielte Mutationen in Maus und Mensch, welche zu Krankheiten und Phänotypen unterschiedlichster Art führen (Buckingham und Relaix, 2007).

Pax3 und Pax7 üben sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus diverse Funktionen aus. PAX3 Mutationen im Menschen stehen im Zusammenhang mit dem Waardenburg-Syndrom. Pax3/7 nehmen auch bei der Muskelzellentwicklung im embryonalen und adulten Organismus wichtige Funktionen ein. Hierbei werden ihnen einerseits bei der Proliferation und dem Überleben, andererseits auch bei der Differenzierung von Muskelvorläuferzellen wichtige Funktionen zugesprochen (Buckingham und Relaix, 2007). Im Nervensystem werden Pax3/7 entlang des dorsalen Neuralrohrs exprimiert, wobei Pax3 auch die Zelldifferenzierung von Neuralleistenzellen und Melanozyten moduliert. Pax3/7 werden auch bei der Entwicklung des optischen Tektums wichtige Rollen zugesprochen. Bei Fehlexpression im Dienzephalon induzieren beide Proteine ektopische tektale Strukturen, was mit der Induktion der anderen Gene des MHR einhergeht, so dass auch diese beiden Pax-Proteine in die positive Rückkopplungsschleife des MHO eingegliedert wurden (Matsunaga et al., 2001). Weitere Untersuchungen weisen auf spezifische Rollen von Pax7 oder Pax3 bei der Festlegung und Differenzierung bestimmter neuronaler Subtypen des Mittelhirns hin (Thomas et al., 2004; Thompson et al., 2008; Fedtsova et al., 2008).

Ein wichtiges Beispiel für die entwicklungsbiologische Bedeutung von Pax-Proteinen spiegelt sich im Phänotyp der natürlich vorkommenden, homozygoten *small eye* Mutation wider, einer Mutation des Pax6-Gens in der Maus (Hill et al., 1991). Diese Mäuse entwickeln aufgrund einer Störung während der Einstülpung der Augenbläschen keine äußerlich sichtbaren Augenstrukturen. Auch im Menschen führen Mutationen des PAX6

Gens zu Entwicklungsstörungen von Augenstrukturen, die sich in Krankheiten, wie Aniridia und der Petersschen Anomalie, manifestieren (Glaser et al., 1992). Pax6 wird von Zellen des optischen Vesikels, in neuralen Vorläuferzellen der Retina, in Zellen des Oberflächenektoderms, der Linsenanlage und von einigen Zellklassen der adulten Retina exprimiert. Dabei übt Pax6 in Kooperation mit anderen regulatorischen Faktoren der Augenentwicklung, den so genannten „*eye field*“ Transkriptionsfaktoren, wichtige Funktionen bei der Entwicklung der Retina und der Linse aus (Ashery-Padan und Gruss, 2001; Zuber et al., 2003). Fehlexpression von *eyeless*, dem zu Pax6 homologen Protein aus *D. melanogaster*, oder Fehlexpression von Pax6 führen zur Entstehung ektopischer Augenstrukturen in der Fliege oder dem Krallenfrosch, und brachte Pax6 den Namen „*master control gene*“ der Augenentwicklung ein (Halder et al., 1995; Chow et al., 1999).

1.4.3 Meis-Proteine

Die Meis-Proteine, Meis1 – 3, sind Homeodomänenproteine. Sie zählen jedoch aufgrund von drei zusätzlichen Aminosäuren zwischen Helix 1 und Helix 2 innerhalb ihrer HD zur Subklasse der TALE-Homeodomänenproteine (*three amino acid loop extension*). Neben dieser atypischen HD enthalten Meis-Proteine eine weitere konservierte Domäne, die MEINOX-Domäne (Burglin, 1997), welche Protein-Protein Interaktionen vermittelt (Chang et al., 1997; Jacobs et al., 1999). Im Meis1-Protein konnte zudem eine C-terminale Transaktivierungsdomäne identifiziert werden (Huang et al., 2005). Meis1 wurde ursprünglich als Onkogen im Zusammenhang mit akuter myeloider Leukämie entdeckt (*myeloid ectopic integration site*) und spielt bei der normalen Bildung von Blutzellen durch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor HoxA9 eine wichtige Rolle (Shen et al., 1997; Calvo et al., 2001). Meis-Proteine üben entsprechend ihrer Expressionsmuster in vielen Geweben des sich entwickelnden oder adulten Organismus vielfältige Funktionen aus. Meis1 und Meis2 sind wichtige Regulatoren der proximal-distalen Regionalisierung der Gliedmaßen, der Muskelzelldifferenzierung und der Entwicklung von Linse und Retina (Mercader et al., 1999; Capdevila et al., 1999; Zhang et al., 2002; Hisa et al., 2004; Berkes et al., 2004; Mercader et al., 2005; Bessa et al., 2008; Heine et al., 2008). Überdies sind Meis-Proteine maßgeblich an der Musterbildung im Hinterhirn von Zebrafisch und *Xenopus* beteiligt (Dibner et al., 2001; Vlachakis et al., 2001; Waskiewicz et al., 2001a; Waskiewicz et al., 2001b; Choe et al., 2002; Maeda et al., 2002; Choe und Sagerstrom, 2005).

Meis-Proteine sind Ko-Transkriptionsfaktoren, d. h. sie üben ihre Funktion in Komplexen mit anderen Proteinen aus. Einige Interaktionspartner konnten bereits identifiziert werden: Meis-Proteine bilden, zusammen mit Pbx-Proteinen, Komplexe mit bHLH (basic Helix-Loop-Helix) Transkriptionsfaktoren, wie MyoD, myogenin, Mrf-4 oder Myf-5 und regulieren dadurch wichtige Schritte bei der Differenzierung von Muskelvorläuferzellen (Knoepfler et al., 1999; Berkes et al., 2004). Während der Blutzellbildung und der Regionalisierung der Gliedmaßen oder des Hinterhirns bilden Meis-Proteine dimere oder trimere Komplexe mit Pbx-Proteinen („*pre B-cell homeobox protein*“) und/oder Hox-Proteinen. Dadurch verändern bzw. stabilisieren sie die Komplexbildung und die DNA-Bindeaffinität von Hox-Proteinen (Mann, 1995; Shen et al., 1997; Chang et al., 1997; Berthelsen et al., 1998; Jacobs et al., 1999; Vlachakis et al., 2001; Williams et al., 2005). Während der Entwicklung des Nervensystems nehmen Hox-Proteine wichtige Funktionen bei der Segmentierung des Myelencephalons und des Rückenmarks ein. Da sie zum Teil in überlappenden Domänen exprimiert werden (Abb. 7), wird angenommen, dass erst durch die Interaktion mit Ko-Transkriptionsfaktoren wie Meis/Pbx-Proteinen, welche im Gegensatz zu Hox-Proteinen spezifische Muster aufweisen, eine spezifische Erkennung regulatorischer Gensequenzen durch die Hox-Proteine ermöglicht wird. Dadurch wird eine adäquate Segmentierung dieser Hirnregionen gewährleistet (Mann und Affolter, 1998).

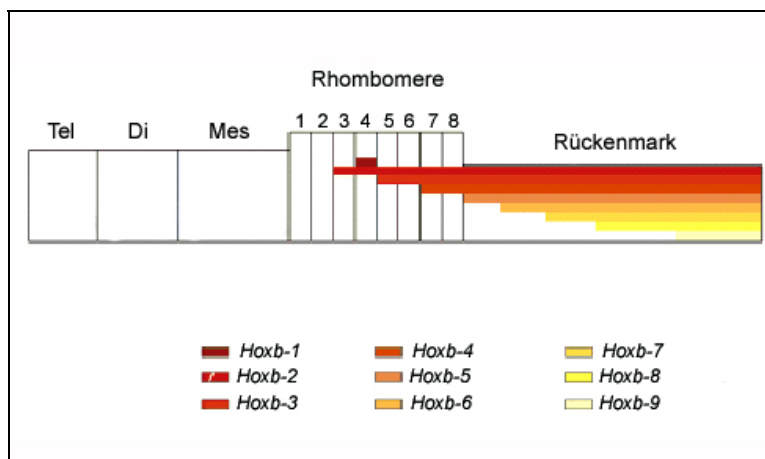


Abbildung 7: Expression von Hox-Genen im frühen Neuralrohr.

Vereinfachte schematische Darstellung der Hox-Genexpression im Neuralrohr der Maus E 8,5. Hox-Gene werden im posterioren Neuralrohr ab dem Rhombomer 3 exprimiert und zeigen stark überlappende Expressionsdomänen. Tel: Telenzephalon; Di: Diencephalon; Mes: Mesencephalon. (Modifiziert nach Hirth und Reichert, 1999)

1.5 Zielsetzung

Meis2 wird im Laufe der Embryonalentwicklung von Vertebraten entlang des Neuralrohrs in spezifischen Mustern exprimiert. Wie zahlreiche Untersuchungen zeigen konnten, üben Meis-Proteine entsprechend dieser Muster bedeutende Funktionen bei der Regionalisierung des posterioren Neuralrohrs aus. *Meis2*-Expression weist jedoch auch im anterioren Neuralrohr spezifische Muster auf. Arbeiten im Labor von Frau PD Dr. Dorothea Schulte konnten zudem zeigen, dass *Meis2* an wichtigen entwicklungsbiologischen Prozessen der Retina beteiligt ist (Heine et al., 2008). Überdies gaben Untersuchungen zur Rolle von *Meis2* bei der Entwicklung des optischen Tektums erste Hinweise auf weitere Funktionen des *Meis2*-Proteins auch in diesem Bereich des sich entwickelnden Nervensystems (Agoston, Diplomarbeit 2005). Daher sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zunächst mit Hilfe weiterer Überexpressionsstudien mittels der *in ovo* Mikroelektroporation ein tieferer Einblick in die Funktion von *Meis2* bei der Entwicklung des optischen Tektums gewonnen werden. Aufbauend auf den Erkenntnissen meiner Diplomarbeit sollten Untersuchungen nach weiteren Zielgenen sowie mögliche, durch die Genmanipulationen bedingte, anatomische Veränderungen in älteren Entwicklungsstadien, Aufschluss über die Funktion von *Meis2* liefern. Wie oben bereits beschrieben, ist bekannt, dass Meis-Proteine ihre Funktion als Ko-Transkriptionsfaktoren ausüben. Die Identifizierung von *Meis2*-Interaktionspartnern ist daher für ein genaues Verständnis der Funktionsweise von *Meis2* bei der Gehirnentwicklung unerlässlich. Bislang beschriebene Interaktionspartner, wie z. Bsp. Hox-Proteine, werden in anterioren Bereichen des Neuralrohrs nicht exprimiert (Abb. 7). Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe biochemischer Methoden neue, bislang noch nicht beschriebene Interaktionspartner von *Meis2* im anterioren Neuralrohr zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Bezugsquelle
Axiophot Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
CCD-Kamera Spot 2 (gekühlt)	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Axioplan 2 Imaging Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Apothekerwaage Spoerhase Typ B6	Sartorius, Göttingen
Borosilikatglas Kapillaren (1.2mm o.d. x 0,65 mm i.d.) (GC120F-10 no. 30-0044)	Harvard Aparatus, USA
Brutschrank für Hühnereier Typ BSS	Ehret GmbH und Co. KG
Eagle Eye Mini Darkroom Cabinet und Transilluminator 2040 EV	Stratagene Amsterdam, Niederlande
ECL Plus Western Blot Detektions Reagentien	GE Healthcare, München
Elektroporations-Impulsgenerator EPI 2500	Dr. Fischer, Heidelberg
Entwicklermaschine Curix60	Agfa, Leverkusen
Gelelektrophoresekammer (Tris-Glyzin Gele)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gelelektrophoresekammer XCell Surelock Minicell	Invitrogen, Karlsruhe
Horizontale Gelelektrophoresekammern Sub Cell GT, Wide Mini Sub Cell GT und Sub Cell 92	Biorad, München
Immobilon-P PVDF-Transfermembran	Millipore GmbH, Schwalbach
Kodak Biomax MR Röntgenfilm	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kryostat CM 3050 S	Leica, Nussloch
Kühlzentrifugen Super T21 mit Rotoren SL-50T und SL-250T, Biofuge fresco	Sorvall/Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Laborwaage Typ 1419 MP8-1	Sartorius, Göttingen
Luminometer Glomax™ (96er Platten)	Promega, Mannheim
Mikrozentrifuge Biofuge primo	Sorvall/Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Mikropipette Puller P-87	Sutter Instrument Co., Novato, CA/ USA
Nupage 12% Bis-Tris Gel 1,0 mm x 12 Spuren	Invitrogen, Karlsruhe
Nupage 3 – 8% Tris-Acetate 1,0 mm x 12 Spuren	Invitrogen, Karlsruhe

Gerät/Hilfsmittel	Bezugsquelle
Photometer GeneQuant	GE Healthcare, München
PCR-Thermocycler MJ Research PTC-200 DNA Engine	Biozym, Hessisch Oldendorf
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Regelbares Netzgerät Model 200/2.0 Power Supply,	Biorad, München
Spektralphotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Spektrophotometer LC-55	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Stereomikroskop MZ12	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Stereomikroskop Stemi SV 11 (mit Canon Powershot G5)	Zeiss, Oberkochen
Schüttelinkubator Typ 3033	GFL, Burgwedel
Sterilbank (Herasafe 12)	Sorvall/Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Thermoschüttler 5436	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell	Biorad, München
Vibratom Typ 1000	Technical Products International, St. Louis, USA
Wärme-Brutschränke Heraeus Typ B6 und B12	Kendro, Hanau
Whatman Chromatographie Filterpapier, 3 MM	Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel
Wolframdraht (0,125 mm)	Plano GmbH, Wetzlar
XCell II Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe

Die Bearbeitung der Abbildungen wurde mit Adobe Photoshop Version 7.0 und 8.0.1 durchgeführt.

2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades wurden, sofern nicht anders angegeben, von Roche Diagnostics (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Enzyme zur Modifikation von DNA, wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) und New England Biolabs (NEB; Schwalbach/Taunus) bezogen.

2.1.2.1 Spezielle Chemikalien

Tabelle 2: Spezielle Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Complete™ Protease Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Blue	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
[³⁵ S]–Methionin	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
DNA-Längenstandards: VI (0,15-2,1 kbp) Best.-Nr.: 1062590 VII (0,37-8,0 kbp) Best.-Nr.: 1209264	Roche Diagnostics, Mannheim
DTT- Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma Fast™ Fast Red TR/Naphtol AS-MX Tabletten (für 1 ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathione Sepharose™ 4B	GE Healthcare, München
Lipofectamine 2000 Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
<u>Proteingrößenstandard:</u> „SeeBlue Plus Prestained” HMW Protein-marker	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED N,N,N',N' Tetramethylethylenamin 25 ml, Best.-Nr.: T9281	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-G Agarose Kügelchen	Roche Diagnostics, Mannheim
IPTG- Isopropyl-β-D thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.3 Komplettsysteme

„Qiagen Plasmid Maxi“ (Qiagen, Hilden)

„Qiaprep® Spin Miniprep Kit” (Qiagen, Hilden)

„Silver Stain Plus” (BIO RAD, München)

„TnT® T7/T3 coupled Reticulocyte Lysate System” (Promega, Mannheim)

„Topo TA-cloning®” (Invitrogen, Groningen NL)

„Dual-Glo™ - Luciferase Assay System“ (Promega, Mannheim)

2.1.4 Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde zur Herstellung von Lösungen bidestilliertes, entionisiertes Wasser verwendet (Milli-Q Academic A10, Millipore GmbH Schwalbach). Wenn angegeben, wurden die Lösungen für 25 min bei 120 °C autoklaviert.

2.1.4.1 Nährmedien für Bakterienkulturen

LB-Flüssigmedium (Luria-Bertani)	Bacto-Trypton/Peptone	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	pH 7,0	
LB-Agar	Bacto-Trypton/Pepton	10 g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
	Bacto-Agar	15 g/l
	pH 7,0	
LB ^{amp} (DH α 5)	LB (s.o.)	
	Ampicillin	0,1 mg/ml
LB ^{amp, tet, chlo}	LB (s.o.)	
	Ampizillin (100 mg/ml)	0,1 mg/ml
	Tetrazyklin (10 mg/ml)	0,01 mg/ml
	Chloramphenicol (35 mg/ml)	0,035 mg/ml

Zur Sterilisation wurden die Medien 25 min bei 120 °C autoklaviert. Für das Herstellen der LB^{amp} Platten wurden die entsprechenden Antibiotika erst nach dem Autoklavieren und anschließendem Abkühlen des LB-Agars hinzugefügt.

2.1.4.2 Medien für die Zellkultur

Wachstumsmedium	FCS (Fetales Kälberserum)	10 %
	L-Glutamin	2 mM
	Penizillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 µg/ml
	in DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Gibco)	
Transfektionsmedium	Optimem-I [®] + GlutamaxI [®] , Gibco	
Trypsin/EDTA	2,5 % (w/v)	

2.1.4.3 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für molekularbiologische Arbeiten.

Lösung	Zusammensetzung
BCIP	25 mg/ml BCIP in H ₂ O (Natriumsalz des BCIP); Stock: 200x
BSA-Gelatine	450 ml 1x PBS 2,2 g Gelatine bei 60 °C lösen auf RT abkühlen 70 g BSA
DEPC-H ₂ O	0,01 % (Diethylpyrocarbonat) über Nacht bei 37 °C schwenken; autoklavieren
Ficoll-Ladepuffer (6x)	15 % Ficoll (Typ 400) 0,05 % Xylencyanol 0,25 % Bromphenolblau
Ethidiumbromidlösung	0,5mg/l in entionisiertem H ₂ O
Prähybridisierungslösung (für Vibratomschnitte):	1x Salz 50 % ultra-reines Formamid 2 % Blocking Reagenz DEPC-H ₂ O
Hybridisierungslösung (für Vibratomschnitte)	1x Salz 50 % ultra-reines Formamid 10 % Dextran-Sulfat (50 %) 1 mg/ml Hefe tRNA (10 mg/ml) 1x Denhardt's (50 x) 2 % Blocking-Reagenz DEPC-H ₂ O
Hybridisierungs-/ Prähybridisierungslösung (<i>whole mount in situ</i> Hybridisierung)	50 % ultra-reines Formamid 5 x SSC pH 4.5 1 % SDS 50 µg/ml Hefe tRNA 50 µg/ml Heparin
Lösung A (1 x SSC):	1 x SSC pH 7,0 50 % Formami 0,1 % Tween 20
Lösung A (0,2 x SSC):	0,2 % SSC pH 7,0 50 % Formamid 0,1 % Tween 20
Lösung I	50% Formamid 5x SSC pH 4,5 1 % SDS
Lösung III	50 % Formamid 5x SSC pH 4.5 0,05 % Tween 20
NBT	50 mg/ml NBT in 70 % DMF in H ₂ O; (Stock: 200x)
NTMT	100 mM NaCl, 2 ml (5 M) 100 mM Tris-HCl pH9,5, 5 ml (2 M) 50 mM MgCl ₂ , 5 ml (1 M) 0,1% Tween 20, 0,1 ml
Paraformaldehyd (PFA)-Lösung	PFA w/v in 1x PBS, 2 – 4 %

Lösung	Zusammensetzung
PBS (Phosphat Buffered Saline, 1x):	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,24 g/l KH_2PO_4 pH 7,1-7,4
PBST(1x):	1x PBS; 0,1 % Tween-20
Proteinase K (Sigma-Aldrich):	10 mg/ml in H_2O (Stock: 2000x)
Salz (10x):	114 g NaCl Tris-HCl 14,04 g 1,34 g Tris Base 7,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7,1 g Na_2HPO_4 100 ml 0,5 % EDTA auffüllen auf 1l mit H_2O , pH 7,5
SSC (Saline Sodium Citrate; 20x):	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH mit 1 M HCl auf 4,5 einstellen; autoklavieren
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris-Acetat 0,05 M EDTA autoklavieren
TBE-Puffer (10x):	1 M Tris 890 mM Borsäure 25 mM EDTA pH 8,0; autoklavieren
TBS (10x):	80 g NaCl 2 g KCl 250 ml Tris-HCl pH 7,5 (1 M); autoklavieren
TBST (1x):	1x TBS; 0,1 % Tween-20
Tris-HCl pH 6,8; 7,5; 8,8; 9,5:	1 M Trizma Base; pH mit HCl einstellen; autoklavieren

2.1.4.4 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für biochemische Arbeiten.

Lösung	Zusammensetzung
Blocklösung für PVDF-Membranen	5 % Magermilchpulver in TBST
Coomassie-Blau Färbelösung	50 % Methanol 10 % Eisessig 0,25 % Coomassie Brilliant Blue G 250
Coomassie Entfärberlösung	25 % Methanol 7,5 % Eisessig in H_2O
Fixierlösung für Gele	10 % Ethanol 10 % Eisessig in H_2O
Glutathion-Elutionspuffer	10 mM Glutathion (reduziert, GE Healthcare), 50 mM Tris-HCl pH 8

Lösung	Zusammensetzung
PonceauS-Färbelösung	5 % w/v PonceauS-Pulver in Eisessig
Puffer A ⁺	10 mM Hepes pH8 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 2 mM DTT “Complete™ Protease Inhibitor Cocktail” Tablette (Roche)
Puffer B ⁺	10 mM Hepes pH8 10 mM KCl 0,1mM EDTA 0,1mM EGTA 2 mM DTT 400 mM NaCl 1 % IGEPAL “Complete™ Protease Inhibitor Cocktail” Tablette (Roche)
Puffer BP ⁺	Puffer A und B im Verhältnis von 3:1,8
Sammelgelpuffer (8x, präparatives Gel)	1 M Tris pH 6,8 0,8 % SDS
SDS-Laufpuffer nach Laemmli (10x)	30g Tris-Base 144 g Glyzin 10 g SDS auf 1 Liter mit H ₂ O bidest. auffüllen
SDS-Probenpuffer (5x)	15 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glyzerol 15 % (w/v) Mercaptoethanol 1,5 % (w/v) Bromphenolblau
„Stripping Buffer“ für PDVF-Membranen	0,1 M Glyzin; pH 2,5 mit HCL einstellen
Transferpuffer (1x) für Tris-Glyzin-Gele	3,03 g Tris-Base 14,4 g Glyzin auf 800 ml mit H ₂ O bidest. auffüllen 200 ml Methanol (Endkonz. 20 %)
Trenngelpuffer (4x, präparatives Gel)	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % SDS
Tris-Acetat Laufpuffer (20x)	12,1 g Tris-Base (1 M) 17,9 g Tricine (1 M) 2 g SDS (70 mM) auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen

2.1.5 Plasmide zur Herstellung von DNA-Konstrukten

Tabelle 5: Für die Herstellung unterschiedlicher DNA-Konstrukte verwendete Vektoren.

Bezeichnung	Größe	Beschreibung bzw. Verwendung	Referenz
pBluescript (pBS) II KS+	3,0 kb	Amp ^r ; zur <i>in vitro</i> Transkription/Translation radioaktiv markierter Proteine	Stratagene, Heidelberg
pCR- II Topo	3,9 kb	Amp ^r ; <i>in vitro</i> Transkription/ Translation; Vektor zur Herstellung von RNA-Sonden	Invitrogen, Karlsruhe
pGex4T1	4,9 kb	Amp ^r ; zur bakteriellen Expression von GST-Fusionsproteinen; N-terminale GST-Fusion.	Promega, Mannheim
pMIW III	6,0 kb	Expressionsvektor, der einen β -Aktin minimalen Promotor des Hühnchens und den RSV-Enhancer enthält und so die Expression nach geschalteter cDNA Sequenzen ermöglicht	(Suemori et al., 1990)
pSlax13-flag	3,0 kb	Amp ^r ; pSlax13 Vektor mit „flag-tag“; <i>in vitro</i> Transkrip./Transl.	Addgene, MA, USA

2.1.6 Plasmide zur Herstellung von RNA-Sonden

Tabelle 6: Plasmide, die als DNA-Matrizen für *in vitro* Transkriptionen zur Herstellung von RNA-Sonden verwendet wurden.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
cAth1	enthält ein 709 bp großes cDNA Fragment des <i>Ath1</i> Gens aus dem Hühnchen in pBS KS, antisense Transkript: NotI/T3	A. Wizenmann, Würzburg
cDbx1	enthält ein 1,6 kbp großes cDNA Fragment des <i>Dbx1</i> Gens aus dem Hühnchen in pBSK, antisense Transkript: SpeI/T7	A. Pierani, Paris, Frankreich
cEn1	enthält ein 800 bp großes cDNA Fragment des Hühnchen <i>Engrailed-1</i> Gens in pBS SK, antisense Transkript: EcoRI/T3	C. Logan, Calgary, Kanada (Logan et al., 1996)
cEn2	enthält ein 500 bp großes cDNA Fragment des <i>Engrailed-2</i> Gens aus dem Hühnchen in pGem-3Z, antisense Transkript: EcoRI/Sp6	M. Wassef, Paris, Frankreich
cEphrinB1	enthält ein 650 bp großes cDNA Fragment des <i>EphrinB1</i> Gens aus dem Hühnchen in pBS KS; antisense Transkript: T7	Todd McLaughlin, La Jolla, CA, USA, (Braisted et al., 1997)
cFgf8	enthält ein 1,5kb großes cDNA Fragment des Hühnchen <i>Fgf8</i> Gens antisense Transkript: NotI / T3	C. Tabin, Boston, USA
GFP	enthält die kodierende Sequenz von <i>GFP</i> in pSlax; antisense Transkript: T7	D. Schulte
cIrx2	enthält ein Fragment des <i>Irx2</i> Gens aus dem Hühnchen in pBS, antisense Transkript: T3	C. Tabin, Boston, USA
cMeis2	enthält ein cDNA-Fragment des <i>Meis2</i> -Gens aus dem Hühnchen in pBS KS; NT: 1-818, antisense Transkript: T3	D. Schulte (Heine et al., 2008)

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
mMeis2	enthält ein cDNA-Fragment des <i>Meis2</i> -Gens aus der Maus in pCR 2; NT: 558 – 1056, <i>antisense</i> Transkript: Sp6	D. Schulte (Heine et al., 2008)
cNkx6.1	enthält ein 800 bp großes cDNA Fragment des <i>Nkx6.1</i> -Gens aus dem Hühnchen; <i>antisense</i> Transkript: T7/EcoRI	H. Rohrer, Frankfurt am Main
cOtx2	enthält ein cDNA Fragment des Hühnchen <i>Otx2</i> -Gens in pBS SK, NT: 1996-1560; <i>antisense</i> : T3	C. Tabin, Boston, USA
cPax2	enthält ein cDNA Fragment des <i>Pax2</i> -Gens aus dem Hühnchen in pBS; <i>antisense</i> : ClaI/ T3	C. Tabin, Boston, USA
cPax3	enthält ein 711 bp großes Fragment des <i>Pax3</i> Gens aus dem Hühnchen in pCRII-Topo-Vektor, NT: 853-1564, <i>antisense</i> Transkript: Sp6	Z. Agoston (Agoston, Diplomarbeit 2005)
cPax6	enthält ein Fragment der Hühnchen <i>Pax6</i> cDNA in pBS SK, <i>antisense</i> Transkript: T3	A. Cheng, Boston, USA
cPax7	enthält ein 785 bp großes Fragment des <i>Pax7</i> Gens aus dem Hühnchen in pCRII-Topo-Vektor, NT: 1318-2103, <i>antisense</i> Transkript: Sp6	Z. Agoston (Agoston, Diplomarbeit 2005)
RCS	enthält ein cDNA-Fragment des Matrixcore-Proteins von RCAS in pBS SK, <i>antisense</i> Transkript: SalI/T3	D. Schulte
cWnt1	enthält die vollständig kodierende Sequenz des <i>Wnt1</i> Gens aus dem Hühnchen (2,2 kb) in pGem4z, <i>antisense</i> Transkript: T7	C. Tabin, Boston, USA
cWnt3a	enthält ein ca. 400 bp großes Fragment des <i>Wnt3a</i> Gens aus dem Hühnchen in pGem3zf, <i>antisense</i> Transkript EcoRI/Sp6	C. Tabin, Boston, USA

2.1.7 Expressionskonstrukte für die Elektroporation

Tabelle 7: Expressionskonstrukte für die Elektroporation.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
cMeis2aHA-pMiw III	enthält die gesamte kodierende Sequenz der <i>cMeis2a</i> Isoform fusioniert an den „HA-Tag“ des Hämophilus influenza Virus	D. Schulte, (Heine et al., 2008)
cMeis2aEnr-pMiw III	enthält die gesamte kodierende Sequenz von <i>cMeis2a</i> fusioniert an die <i>engrailed</i> Repressordomäne aus <i>D. melanogaster</i> sowie einen einfachen „Myc-Tag“	D. Schulte, (Heine et al., 2008)
Meis2ΔHDEnR –RCAS(B)	enthält die As 1-190 von <i>Meis2a</i> des Hühnchens fusioniert an die <i>engrailed</i> Repressordomäne aus <i>D. melanogaster</i>	D. Schulte, (Heine et al., 2008)
Meis2ΔMDEnR-pMIW III	enthält die As 199-400 von <i>Meis2a</i> des Hühnchens fusioniert an die <i>engrailed</i> Repressordomäne aus <i>D. melanogaster</i>	D. Schulte, (Heine et al., 2008)
GFP-pMiw II	enthält die kodierende Sequenz des „enhanced“ grünfluoreszierenden Proteins	(Schulte et al., 1999)
Otx2Δ1-53-pMIW III	enthält NT: 196-903 der kodierenden Sequenz des <i>Otx2</i> Gens aus dem Hühnchen fusioniert an den „Flag-tag“	D. Schulte, unpubliziert

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Otx2-pMiw III	enthält die gesamte kodierende Sequenz des <i>Otx2</i> Gens aus dem Hühnchen	D. Schulte, unpubliziert
Pax3HA-pMiw III	enthält die gesamte kodierende Sequenz des <i>Pax3</i> Gens aus dem Hühnchen fusioniert an den „HA-tag“ des Hämophilus influenza Virus	D. Schulte, unpubliziert
Pax6-pMIW III	enthält die gesamte kodierende Sequenz des humanen <i>Pax6</i> Gens in pMIWIII	D. Schulte, (Heine et al., 2008)
Pax7HA-pMIW III	enthält die gesamte kodierende Sequenz des <i>Pax7</i> Gens aus dem Hühnchen fusioniert an den „HA-tag“ des Hämophilus influenza Virus	D. Schulte, unpubliziert
Fgf8-pMIW III	enthält die gesamte kodierende Sequenz des <i>Fgf8b</i> Gens aus dem Hühnchen	D. Schulte und K. Bumsted O`Brien, (Badde und Schulte, 2008)
Soho1EnR-pMIW III	enthält die gesamte kodierende Sequenz von <i>Soho1</i> aus dem Hühnchen fusioniert an die <i>engrailed</i> Repressordomäne aus <i>D. melanogaster</i>	D. Schulte, (Schulte und Cepko, 2000)

2.1.8 Expressionskonstrukte für Reporteranalysen

Tabelle 8: Expressionskonstrukte für Reporteranalysen.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pIGCluc	Reporterkonstrukt: enthält 4 Gal4-Bindestellen, CCAat-Box, eine TATA-box + das Gen für die <i>Firefly</i> -Luziferase im pSP65 Vektor	T. Czerny, Wien (Heimbucher et al., 2007)
pMC-Gal4-Otx2	Fusionskonstrukt aus der gesamten kodierenden Sequenz des <i>Otx</i> -Gens aus der Maus + Gal4-DNA-Bindedomäne + nukleares Lokalisations-signal	T. Czerny, Wien (Heimbucher et al., 2007)
pMC-Gal4-Otx2 Δ 1-100	Fusionskonstrukt aus den As 101-289 von Otx2 aus der Maus + Gal4-DNA-Bindedomäne + nukleares Lokalisationssignal	T. Czerny, Wien (Heimbucher et al., 2007)
Tle4-pKW2T	enthält die gesamte kodierende Sequenz des <i>Tle4/Grg4</i> -Gens aus der Maus	T. Czerny, Wien (Heimbucher et al., 2007)
TK-Renilla-pRL	Reporterkonstrukt: enthält den TK- (Thymidin Kinase) Promotor vor der kodierenden Sequenz der <i>Renilla</i> -Luziferase	Promega, Mannheim

2.1.9 Viren für die Injektion

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete RCAS-Viren.

Virus	Referenz
GFP-RCAS-BP (A)	Cliff Tabin, Boston, USA
Shh-RCAS-BP (A)	B. Riddle, Pennsylvania, (Riddle et al., 1993)

2.1.10 Expressionskonstrukte für die Protein-Interaktionsstudien

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete GST-Fusionskonstrukte.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Meis2GST-pGex4T1	enthält die vollständige kodierende Sequenz von <i>Meis2a</i> in pGex4T1 und einen dreifachen „HA-Tag“	diese Arbeit
Meis2 _[1-199] GST-pGex4T1	enthält die As 1-199 von <i>Meis2a</i> im pGex4T1-Vektor	diese Arbeit
Meis2 _[190-400] GST-pGex4T1	enthält die As 190-400 von <i>Meis2a</i> im pGex4T1-Vektor und einen dreifachen „HA-Tag“	diese Arbeit

Tabelle 11: DNA-Konstrukte für die *in vitro* Transkription/Translation.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Otx2 _[1-289] - pBS	enthält die gesamte kodierende Sequenz des Hühnchen <i>Otx2</i> Gens; <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Otx2 _[36-289] - pCR II Topo	Nt: 141-903; As: 36-289, <i>sense</i> : Sp6	diese Arbeit
Otx2 _[36-289] - pSlaxflag	Nt: 141-903; As: 36-289, <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Otx2 _[54-289] - pSlax-flag	Nt: 196-903 ; As: 54-289; <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Otx2 _[70-289] - pSlax-flag	Nt: 244-903; As 70-289; <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Otx2 _[102-289] - pCR II Topo	Nt: 339-903; As 102-289; <i>sense</i> : Sp6	diese Arbeit
Otx2 _[1-109] - pSlax-flag	Nt: 1-363 ; As 1-109; <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Otx2 _[1-164] - pSlax-flag	Nt: 1-526; As 1-164; <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Otx2 _[1-223] - pSlax21	Nt: 1-699 ; As 1-223; <i>sense</i> : T7	diese Arbeit
Otx2 _[36-164] - pSlax-flag	Nt: 141-526; As 36-164; <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Otx2 _[36-109] - pSlax-flag	Nt: 141-363 ; As 36-109; <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Otx2 _[54-164] - pSlax-flag	Nt: 196-526; As: 54-164; <i>sense</i> : T3	diese Arbeit
Pax6EP1-pRC	enthält die gesamte kodierende Sequenz des <i>Pax6</i> -Gens aus dem Menschen im pRC/CMV Vektor (ohne 5a Insertion); <i>sense</i> : T7	D. Engelkamp

2.1.11 Antikörper

2.1.11.1 primäre Antikörper

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper.

Antigen	Wirt	WB	IHC	Bezugsquelle
α -Tubulin	Maus	1:5000	-	Abcam
GFP	Kaninchen	-	1:5000	Molecular Probes
HA	Ratte	-	1:1000	Roche Diagnostics
HA-(HRP-gekoppelt)	Ratte	1:10000	-	Roche Diagnostics
Meis2	Kaninchen	1:15000	1:5000	Arthur Buchberg, Kimmel Cancer Center, Pennsylvania
Neurofilament-Protein (RMO270.7)	Maus	-	1:200	Virginia Lee, University of Pennsylvania Medical School
Pax3	Maus	1:10	1:5	DSHB
Pax6 (2.38)	Maus	1:10	-	Dieter Engelkamp, (Engelkamp et al., 1999)
Pax6	Maus	-	1:5000	DSHB
Pax7	Maus	1:10	1:5	DSHB
Parp1	Kaninchen	1:4000	-	Biospan Lifescience
Otx2	Ziege	1:2000	1:40	R & D Systems

2.1.11.2 sekundäre Antikörper

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper

Wirt und Antigen	IgG- Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-Kaninchen	HRP	1:8000	Cell Signaling (Bestellnr: 7074)
Ziege anti-Maus	HRP	1:10000	Sigma Aldrich, (Bestellnr: A4416)
Rind anti-Ziege	HRP	1:30000	Jackson Immuno-Research Lab.
Ziege anti-Kaninchen	Alexa Fluor [®] 488	1:1000	Molecular Probes
Ziege anti-Kaninchen	Alexa Fluor [®] 594	1:1000	Molecular Probes
Ziege anti-Maus	Alexa Fluor [®] 488	1:1000	Molecular Probes
Ziege anti-Maus	Alexa Fluor [®] 594	1:1000	Molecular Probes
Ziege anti-Ratte	Cy3 [™]	1:1000	Jackson Immuno-Research Lab.

2.1.12 Oligonukleotide

Die Herstellung der in dieser Arbeit aufgeführten Oligonukleotide wurde von der Fa. Eurofins MWG Operon (Martinsried) durchgeführt.

2.1.12.1 generelle Oligonukleotide

Tabelle 14: Oligonukleotide für die Amplifikation der DNA-Konstrukte, zur Herstellung der RNA-Sonden und für Klonierungen.

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3'-Richtung
M13 forward	CAT TTT TGC TGC CGG TCA
M13 reverse	GTA CCA GTA TCG ACA AAG
T3+4	GCG CAA TTA ACC CTC ACT AAA GGG AA
T7+4	GCG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG
pGex Forward	AAG CCA CGT TTG GTG GTG
pGex Reverse	GAG CTG CAT GTG TCA GAG G
Sp6	CAT TTA GGT GAC ACT ATA G

2.1.12.2 spezifische Oligonukleotide

Tabelle 15: Spezifische Oligonukleotide, welche für die Herstellung verschiedener DNA-Konstrukte verwendet wurden.

Labornr.	Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' - Richtung
485	Otx2_1	CCC AAG CTT ATG ATG TCT TAT CTT AAG
486	Otx2_2	CCC TCT AGA TCA CAA AAC CTG GAA CTT C
487	Otx2_aa35	CCC AAG CTT ATG CGA AAG CAG CGG CGG GAG
491	Otx2_aa102	CCC AAG CTT ATG AAC GGG GGC CAG AAC AA
494	Otx2_tag-5-1	AAA GGT CTC CCA TGA TGT CTT ATC TTA AG
495	Otx2_tag-5-2	AAA GGT CTC CCA TGC GAA AGC AGC GGC GGG AG
496	Otx2_tag-5-3	AAA GGT CTC CCA TGG AGG CCC TGT TCG CCA AG
497	Otx2_tag-5-4	AAA GGT CTC CCA TGG AGG TGG CCT TGA AAA TC
498	Otx2_tag-3-1	GCG GAA TTC AAA ACC TGG AAC TTC C
499	Otx2_tag-3-2	GCG GAA TTC CTC ACC TTG TTC TG
500	Otx2_tag-3-3	GCG GAA TTC AGG GGA TCG GAG AG

2.1.13 Organismen

2.1.13.1 Hühnchen (*Gallus gallus*)

Für die Elektroporation wurden befruchtete White-Leghorn Eier von der Geflügelfarm Körner (Frankfurt) verwendet. Für die Virusinjektionen wurden befruchtete serum-pathogen freie (SPF) Eier von Charles River (Sulzfeld) verwendet

Die befruchteten Eier wurden bei 12 °C gelagert und nach Bedarf bei 37,8 °C in einem Feuchtinkubator bebrütet. Die unterschiedlichen Stadien von Hühnchenembryos wurden als Anzahl der Tage in der Embryonalentwicklung (E) oder nach Hamburger und Hamilton (HH, 1951) definiert.

2.1.13.2 Mäuse

CD-1 Stamm: Zucht am MPI für Hirnforschung, Frankfurt am Main. Diese wildtypischen Mäuse wurden für Vibratomschnitte und anschließender *in situ* Hybridisierung verwendet.

2.1.13.3 Bakterien

DH5 α (*Escherichia coli*):

F- Δ lacU169 (σ 80 lacZ) Δ M15 hsdR17 recA1 endA1 supE44 gyrA96 thi-1 relA1.

DH5 α wurden als chemisch kompetente Zellen mit Hilfe der Hitzeschock-Transformation zur Vermehrung und Gewinnung von Plasmiden verwendet.

BL21-Gold (DE3) pLysS (*Epicurian coli*[®], Stratagene)

E. coli B F⁻ ompT hsdS($r_B^- m_B^-$) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [pLysS Cam^r]

BL21-Gold (DE3) pLysS wurden als chemisch kompetente Zellen mit Hilfe der Hitzeschock-Transformation zur bakteriellen, IPTG-induzierten Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet.

2.1.13.4 Zellen

NIH3T3-Zellen (Jainchil, et al., 1969): immortalisierte, kontakt-inhibierte Mausembryo-Fibroblasten; adhären.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1.1 Transformation von Bakterien

Zur Amplifikation von DNA oder zur bakteriellen Expression von Proteinen wurde Vektor-DNA in chemisch kompetente DH5 α bzw. BL21-Gold (DE3) pLysS Bakterien des Stammes *E. coli* transformiert. Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien erfolgte nach (Inoue et al., 1990). Nachdem die Bakterien auf Eis aufgetaut waren, wurde das gewünschte Plasmid zugegeben (2,5 μ l einer Ligation bzw. minimale DNA-Mengen aus einer Mini- oder Maxi-Präparation). Es folgte eine 30minütige Inkubation der Bakterien auf Eis. Die anschließende Hitzeschockreaktion von 45 sek bei 42 °C führt zur Aufnahme der DNA in die Bakterien. Anschließend wurden 40 μ l der transformierten Bakterien auf vorgewärmten Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten Vektoren trugen das Ampizillin Resistenzgen. Durch das Antibiotikum Ampizillin (100 μ g/ml) in den Agarplatten konnte sichergestellt werden, dass nur transformierte Kolonien wuchsen. Aufgrund ihrer zusätzlichen Resistenzen, wurden für die Selektion transformierter BL21-Gold (DE3) pLysS Bakterien Agarplatten mit zwei weiteren Antibiotika Tetrazyklin (10 μ g/ml) und Chloramphenicol (35 μ g/ml) verwendet.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA basiert auf der alkalischen Lyse, gefolgt von der Bindung der Plasmid-DNA an den Qiagen Anionen-Austausch-Filter bei niedriger Salzkonzentration und geringem pH-Wert. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch anschließende Waschschrte bei mittlerem Salzgehalt entfernt. Die Plasmid-DNA wird schließlich durch einen Puffer mit geringem Salzgehalt eluiert und durch Präzipitatbildung mit Isopropanol entsalzt und konzentriert. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurden 5 ml LB-Medium (0,1 mg/ml Ampizillin) mit einzelnen Bakterienkolonien angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Schüttler inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei 4 °C und 3500 rpm 10 min lang abzentrifugiert und mit Hilfe des „*QIA-prep Spin Miniprep Kit*“ (Qiagen, Hilden) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Die DNA wurde schließlich in 50 μ l HPLC-Wasser aufgenommen. Zur Isolierung größerer DNA-Mengen wurden 500 ml LB-Medium (0,1 mg/ml Ampizillin) mit einer 5 ml Bakterienkultur angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Schüttler inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte hier mit Hilfe des

„*QIAGEN Plasmid Maxi Kit*“ (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers. Die DNA wurde standardmäßig in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels eines Photometers (Amersham Pharmacia Biotech). Die Nukleinsäurekonzentration errechnete sich aus der OD, der Verdünnung und einem für DNA bzw. RNA spezifischen Multiplikationsfaktor. Eine optische Dichte von 1 entspricht ca. 50 µg DNA/ml. Das Verhältnis der OD₂₆₀ nm und der OD₂₈₀ nm gab Auskunft über die Proteinkontamination in der Lösung.

2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Synthese und Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente für Klonierungen oder zum Einsatz in einer *in vitro* RNA-Transkriptionsreaktion für die Herstellung von RNA-Sonden, wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) durchgeführt. Der zu vervielfältigende DNA-Abschnitt wird durch die Auswahl geeigneter synthetischer Oligonukleotide (Primer) festgelegt, welche die entsprechende DNA-Sequenz flankieren und zu dieser komplementär sind. Der ausgewählte DNA-Abschnitt wird durch (1) zyklisches Denaturieren der DNA-Vorlage, (2) Anlagerung (Hybridisierung) der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA-Matrize und schließlich (3) durch die Verlängerung der Oligonukleotide mit Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase vervielfältigt. Bei einer so genannten Kolonie-PCR wurde eine kleine Menge Plasmid-DNA tragender *E. coli*-Zellen direkt in den Reaktionsansatz gegeben. Die Polymerisationszeit und die Hybridisierungstemperatur wurden jeweils in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide und der Länge der erwarteten PCR-Produkte (1 kb/min) gewählt.

PCR- Standardansatz zu analytischen Zwecken (25 µl):

PCR-Zyklus Parameter

Komponente	Volumen
10x Puffer (Roche)	2,5 µl
dNTPs (je 0,2 mM)	0,5 µl
5' Oligonukleotid (10 pMol/µl)	0,5 µl
3' Oligonukleotid (10 pMol/µl)	0,5 µl
Taq-DNA -Polymerase (Roche)	0,1 µl
DNA	„Dip“
H ₂ O	20,9 µl

94 °C 2 min
 36 Zyklen:
 94 °C 30 sek
 53 °C 30 sek
 72 °C 90 sek
 53 °C 30 sek
 72 °C 90 sek
 72 °C 5 min

Zur Amplifikation von DNA, die für Klonierungen verwendet werden sollte, wurde für die PCR die „ProofStart DNA-Polymerase“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen) eingesetzt. Durch ihre zusätzliche 3' → 5' Exonuklease-Aktivität, wird durch Verwendung dieser Polymerase die Fehlerrate der DNA-Synthese minimiert. Zur Herstellung neuer DNA-Konstrukte durch die Synthese von cDNA aus isolierter Gewebe-RNA, wurde das „One-Step-RT-PCR“-Verfahren ebenfalls nach Angaben des Herstellers angewandt (*Super Script One-Step-RT-PCR[®]-Kit*, Invitrogen). Dieses Verfahren ermöglicht es zwei Schritte das Umschreiben von RNA in cDNA mittels einer reversen Transkriptase und die darauf folgende Amplifikation der entstandenen cDNA-Fragmente in einem PCR-Ansatz durchzuführen. Als Matrize diente isolierte Gesamt-RNA des Hühnchens, Stadium HH 15-17. Für die Reaktion wurden 0,6 µg mRNA eingesetzt.

2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Das Schneiden von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde in den gebrauchsfertigen Puffern der Hersteller in 30 µl Ansätzen unter den von den Herstellern angegebenen Bedingungen durchgeführt. Es wurden jeweils 10 U des Enzyms und 2-6 µg DNA eingesetzt. Vor dem Einsatz der DNA-Fragmente für eine Ligation wurde der gesamte Ansatz über Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.10) aufgetrennt und anschließend über Glasmilch aufgereinigt (Abschn. 2.2.11)

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in 5 µl Ansätzen mit T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Best. Nr.: 481 220) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer bei 4 °C über Nacht ligiert. Die Mengen der zur Ligation eingesetzten DNA-Fragmente sowie die der T4-Ligase wurden je nach Reaktionsbedingungen variiert. Um während der Ligationsreaktion die Rezirkularisierung von Plasmid-Fragmenten zu vermeiden, wurden zuvor die 5'-Phosphatgruppen der Plasmid-DNA-Fragmente durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, Roche Diagnostics, Best. Nr.: 1758 250) nach Anweisungen des Herstellers entfernt.

2.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. In einem elektrischen Feld wandern Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Die Wandergeschwindigkeit der Moleküle ist dabei von der Länge des Fragments und der Porengröße des Gels abhängig, so dass die DNA- oder RNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Zur Herstellung des Gels wurde

Agarose in einer Konzentration von 1 % - 2 % in 1x TAE- (für DNA-Fragmente) oder TBE- (für RNA-Fragmente) Puffer aufgekocht, bis die Agarose gelöst war und anschließend in einen Gelschlitten gegossen. Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ficoll-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 80 V in 1x TAE- bzw. 1x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurden geeignete Längenstandards aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA/RNA-Fragmente im Gel 10 - 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) gefärbt und schließlich mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert (*Eagle Sight MCF Application*, Stratagene, Heidelberg).

2.2.1.8 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel

Silikate, z.B. Glas, binden DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze und können nach einem Waschschriff mit einem Salz-Ethanol-Puffer, durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen (z. Bsp. H₂O) wieder eluiert werden. Das Eluat kann direkt, d.h. ohne weitere Fällungen, weiterverwendet werden. Da die chaotropen Salze die Agarose auflösen, lässt sich auf diese Weise DNA aus Agarose-Stücken isolieren. Zunächst wurde die zu isolierende DNA-Bande mit Hilfe einer Einwegklinge aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Gelstück wurde gewogen, mit dem dreifachen Volumen einer Natriumiodid-Lösung (90,8 g NaJ, 1,5 g NaSO₃ pro 90 ml H₂O) versetzt und für 5 - 10 min bei 50 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nachdem sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte, wurde 1,5 µl gut resuspendierte Silica-Suspension (Glasmilch) hinzugegeben, der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend für 15 sek zentrifugiert. Das Sediment wurde dann dreimal mit jeweils 100 µl einer Ethanolwaschlösung gewaschen (50 % Ethanol, 10 mM Tris pH 7,5). Zum Eluieren der DNA wurden 5 – 8 µl HPLC-Wasser hinzugegeben, und der Ansatz für 3 min in einem Wärmeblock bei 42 °C inkubiert. Die Glasmilch wurde schließlich abzentrifugiert und der Überstand mit dem isolierten DNA-Fragment in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.2.2 *In ovo* Mikroelektroporation

Die *in ovo* Mikroelektroporation (nach Momose et al., 1999) ist eine effektive Methode, um die Funktion von Genen in einem sich entwickelnden Organismus zu untersuchen. Dafür wird die kodierende Sequenz der zu untersuchenden Gene in einem geeigneten Expressionsplasmid in die Zellen eines Organismus transferiert, wo sie mit Hilfe der zelleigenen Transkriptions- und Translationsmaschinerie exprimiert werden. Für den Gentransfer werden dem Zielgewebe durch zwei Mikroelektroden elektrische Impulse gegeben (Abb. 8). Die elektrischen Impulse permeabi-

lisieren kurzzeitig die Zellmembranen, wodurch die vorher in das Neuralrohr injizierte DNA-Lösung in die Zellen eindringen kann. Die negativ geladene DNA bewegt sich in Richtung des positiven Pols und wird daher in die Zellen aufgenommen, die nahe der Anode liegen. Die zu elektroporierende Region im Gewebe wird durch entsprechendes Positionieren der beiden Elektroden festgelegt.

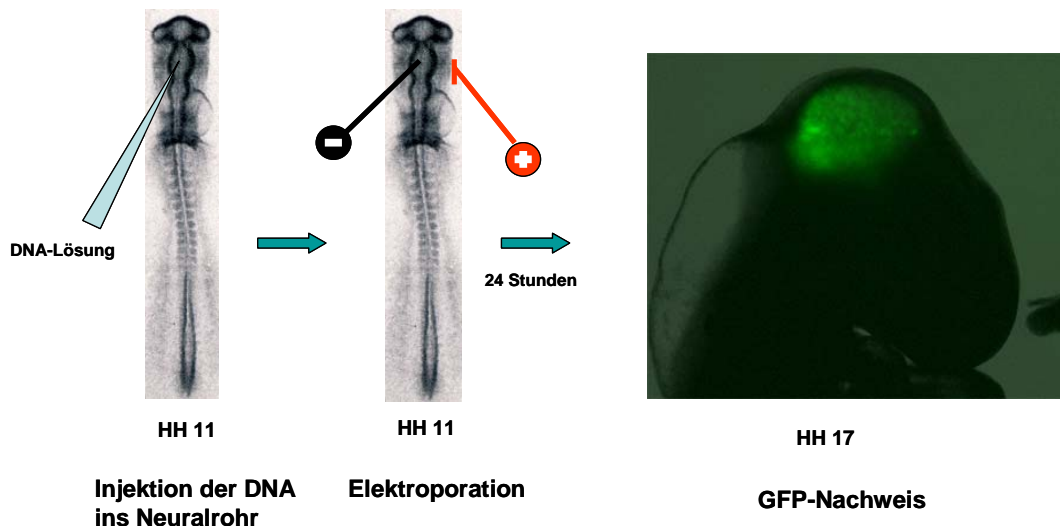


Abbildung 8: Schematische Darstellung der *in ovo* Mikroelektroporationstechnik.

Befruchtete Eier wurden horizontal bei 37,8 °C bis zum Entwicklungsstadium HH 10-11 inkubiert. Zunächst wurde mit einer Pinzette im Bereich der Luftkammer des Eies ein Loch geschlagen, was ein Absinken des Embryos bewirkt, um so den Embryo beim Öffnen des Eies nicht zu verletzen. Anschließend wurde ein kleiner Bereich der Schale über dem Embryo entfernt. Die jeweilige DNA-Lösung wurde dann mit Hilfe einer Mikroinjektionskapillare in das Neuralrohr injiziert. Nach Zugabe von 250 µl sterilem 1x PBS wurde die Kathode (spitzer Wolframdraht) direkt in das zu elektroporierende Gewebe inseriert. Die Anode (Platindraht) wurde von Hand am äußeren Rand des Embryos so platziert, dass sich Anode und Kathode direkt gegenüber stehen. Es wurden drei Stromstöße von 10 Volt und einer Impulszeit von je 50 ms gegeben. Schließlich wurde das Loch in der Eierschale mit Tesafilm abgeklebt und bis zum gewünschten Alter bei 37,8 °C inkubiert. Die Embryos wurden nach dem Ernten in 4 % PFA fixiert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Ab E 5 wurden nur die Köpfe und ab E 7 nur die Hirne der Embryos geerntet und aufbewahrt. Zur Kontrolle der Elektroporation befand sich immer zusätzlich ein GFP-Expressionskonstrukt in der DNA-Lösung. Die Expression des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) in den Zellen konnte bis zu 48 Stunden nach Elektroporation mittels Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb.8).

DNA-Lösung:

Expressionskonstrukt	2 – 3 µg/µl
GFP-Expressionskonstrukt	0,8 µg/µl
10x Fast Green FCF	
(Sigma-Aldrich, Steinheim)	1 µl (0,025 % w/v)
1x PBS	auf 10 µl Gesamtvolumen

2.2.3 Virusinjektion

Die Funktion von Genen innerhalb eines sich entwickelnden Organismus lässt sich auch mit Hilfe retroviraler Fehlexpression untersuchen. Für den Gentransfer wird hier der natürliche Mechanismus einer Virusinfektion ausgenutzt. Für diese Versuche wurde der RCAS-Virus verwendet („Replication Competent ASLV with Splice acceptor site“). RCAS, ein vogel-spezifischer Virus, gehört zur Familie der Retroviren und ist aus dem SR-A Stamm der Rous sarcoma Viren (RSV) entstanden. RSV tragen außer den viralen Genen zusätzlich das Onkogen *src* in ihrem genetischen Material. Die kodierende Sequenz des zu untersuchenden Gens, kann gegen das *src* Onkogen ausgetauscht werden. Dabei behalten die RCAS-Vektoren die *scr splice acceptor site*. Im Gewebe beginnt der Virus seinen Lebenszyklus mit der Bindung des viralen Hüllproteins an einen Oberflächenrezeptor der Zielzelle. Durch Fusion der viralen und zellulären Membranen gelangt das virale Erbgut in das Zytoplasma der Wirtszelle. Dort wird es mit Hilfe des retroviralen Enzyms „reverse Transkriptase“ in doppelsträngige DNA umgeschrieben und in das Genom des Wirtes integriert. Das Transgen wird nun als Teil des Wirtgenoms exprimiert, bei jeder Zellteilung an beide Tochterzellen weitergegeben und daher in infizierten Zellen und in deren Nachkommen ektopisch gebildet. Da es sich beim RCAS-Virus um einen replikationskompetenten Virus handelt, kommt es in den infizierten Zellen zusätzlich zur Bildung neuer Viruspartikel, die ihrerseits weitere Zellen infizieren können.

Die Virusinjektionen wurden mit SPF-Eiern an Hühnchenembryos im Stadium HH 10-11 durchgeführt. Es wurden 8 µl Virus-Aliquots (die Virustiter lagen zwischen 7×10^7 und 2×10^8) mit 1 µl Polybrene (0,08 mg/ml; Sigma-Aldrich, Steinheim, nur bei RCAS-B) und 1 µl „Fast Green“ (0,025 % w/v) vermischt. Die Lösung wurde mit Hilfe einer Mikroinjektionskapillare in das gesamte Neuralrohr des Embryos injiziert. Anschließend wurde das Ei mit Tesafilm abgeklebt und bei 37,8 °C bis zum gewünschten Alter inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Embryos bis zur weiteren Verwendung in 4 % PFA bei 4 °C gelagert. Die Produktion des von RCAS abgeleiteten Retrovirus wurde nach Ausubel et al. (1998) durchgeführt. Die verwendeten RCAS-Viren wurden von Frau PD Dr. Dorothea Schulte zur Verfügung gestellt.

2.2.4 Genexpressionsanalyse

Für die Analyse der Genexpression wurde die Methode der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Dieses Verfahren ermöglicht es, die Expression verschiedener Gene im Gewebe (*in situ*) zu lokalisieren, um so die Muster der differentiellen Genexpression aufzuzeigen. Dabei wird die mRNA des zu untersuchenden Gens im Gewebe gegen eine komplementäre RNA-Sonde hybridisiert und der Komplex durch eine enzymatische Farbreaktion im Gewebe nachgewiesen. Die eingesetzten RNA-Sonden wurden mit Hilfe der *in vitro*-Transkription in Gegenwart von Digoxigenin (Dig) oder Fluoreszin (FITC)-gekoppelten Uraciltriphosphaten (UTP) hergestellt. Die Dig- bzw. FITC-markierten Nukleotide in den RNA-Sonden werden von spezifischen, an das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Antikörpern α -Dig bzw. α -FITC erkannt. Die Farbstoffe NBT (4-Nitro blue tetrazoliumchloride) und BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) dienen als Substrate für die AP. Die Phosphatgruppe des BCIP wird durch die katalytische Aktivität des Enzyms abgespalten. NBT wird durch die aktivierte Form des BCIP reduziert. BCIP ist in seiner dephosphorylierten Form hellblau, während die reduzierte Form des NBT einen violetten, schwer löslichen Niederschlag bildet. Zusammen bilden beide Farbstoffe ein blau-violettes Präzipitat überall dort im Gewebe, wo zuvor die Dig- bzw. FITC-markierte RNA-Sonde an endogene mRNA-Moleküle gebunden hat.

2.2.4.1 *In vitro*-Transkription zur Synthese von RNA-Sonden

Die Synthese von RNA-Sonden, welche für die *in situ*-Hybridisierung verwendet wurden, erfolgte mittels *in vitro*-Transkription. In diesem System werden RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3, T7 (*E. coli*) oder SP6 (*Salmonella typhimurium*) verwendet, die in Gegenwart von Ribonukleotiden RNA-Fragmente synthetisieren. Als Matrize dient hierfür ein cDNA-Fragment, das zuvor aus isolierter Gewebe-RNA gewonnen wurde. Für die *in vitro*-Transkription muss sich das cDNA-Fragment in einem entsprechenden Vektor stromabwärts des spezifischen Phagenpromotors befinden. Durch die Wahl einer geeigneten Polymerase, wird mit Hilfe der Transkriptionsreaktion ein RNA-Fragment erzeugt, welches gegenläufig zum cDNA-Fragment ist („*antisense*“ Fragment). Nur so ist die Sonde komplementär zur entsprechenden RNA im Gewebe, und eine Hybridisierungsreaktion kann stattfinden. Vor dem Einsatz des rekombinanten Plasmids für die Transkriptionsreaktion wurde entweder das sich in dem Plasmid befindende cDNA-Fragment mittels PCR amplifiziert, oder das Plasmid (4-6 μ g) wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen an der Stelle gespalten, an der die Transkriptionsreaktion stoppen soll. Das PCR Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte in der *in vitro*-Transkription eingesetzt. Im Falle eines Restriktionsverdaus wurde die linearisierte Plasmid-DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na Acetat (pH 5,2) und 2-fachen Volumen 100 % Ethanol 30 min bei -20 °C gefällt, dann 30

min bei 4 °C und 13000 rpm pelletiert und anschließend mit 70 % Ethanol in H₂O gewaschen. Das DNA Sediment wurde dann bei RT getrocknet und in einer Endkonzentration von 1 µg/µl in H₂O DEPC aufgenommen.

Markierung von RNA mit Digoxigenin oder Fluoreszin:

Nachdem das entsprechende DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotide T3+4/T7+4 oder M13F/M13R) oder das Plasmid mit einem Restriktionsenzym linearisiert vorlag, wurde die RNA-Sonde mit dem DNA-Fragment als Matrize und mit der geeigneten RNA-Polymerase in Gegenwart von Digoxigenin- oder Fluoreszin-markierten Ribonukleotiden synthetisiert.

Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
10x Transkriptionspuffer	2 µl
„Digoxigenin RNA Labeling Mix“ oder „Fluorescein RNA Labeling Mix“ (beide Roche Diagnostics)	2 µl
DNA	1 µg linearisiertes Plasmid oder 5 µl PCR Reaktion
RNaseOut Inhibitor (Invitrogen)	1 µl
RNA Polymerase (T3, T7 oder SP6) (Roche Diagnostics)	1 µl
H ₂ O DEPC	auf 20 µl Endvolumen

Für die Synthesereaktion wurde der Ansatz 1,5 – 2 Stunden in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Degeneration der Plasmid-DNA wurden dem Ansatz anschließend 2 µl einer RNase-freien DNase (Invitrogen) hinzugefügt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle der Synthesereaktion wurde 1 µl der Probe auf ein TBE-Agarosegel aufgetragen. Der restliche Ansatz wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 70 µl gebracht und die RNA durch Zugabe von 8 µl 4 M LiCl und 180 µl EtOH über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert, in 50 µl DEPC aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Im Falle einer Markierung mit FITC wurde die RNA-Sonde ein weiteres Mal präzipitiert. Dazu wurde die Probe nach der ersten Fällung erneut in 70 µl DEPC-Wasser aufgenommen, danach wie oben beschrieben präzipitiert und schließlich in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Für den Einsatz in der *in situ*-Hybridisierungsreaktion wurde eine entsprechende Menge der Probe in Hybridisierungslösung aufgenommen. Für die *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryos wurde in der Regel eine ca. 1:200 – 1:250 Verdünnung (4 - 6 µl/ ml) der Sonde eingesetzt, auf Vibratomschnitten war eine 1:500 – 1:1000 Verdünnung in der Regel ausreichend.

2.2.4.2 RNA *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryos

Die *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryos wurde nach (Schulte und Cepko, 2000) durchgeführt. Im Folgenden wurden für die Waschschriffe sofern nicht anders angegeben stets 1x Pufferlösungen verwendet.

Tag 1: Prähybridisierung und Hybridisierung

Zunächst wurden die Embryos über eine ansteigende Methanolreihe 25 %, 50 %, 75 % und 100 % Methanol in PBST dehydriert (5 min pro Schritt). Nach 30 min leichtem Schütteln bei RT in 100 % Methanol wurden die Embryos entweder bei -20 °C gelagert oder in der gleichen Methanolreihe, diesmal aufsteigend, wieder rehydriert. Um später eine bessere Verteilung der RNA-Sonde im Gewebe zu ermöglichen wurden nach 2 x 5 min Waschen in PBST mit Hilfe einer sehr feinen Pinzette kleine Löcher in das Neuralrohr der Embryos gestochen. Die Embryos wurden dann 30 – 60 min in 6 % Wasserstoffperoxid (in PBST) gebleicht. Nach 3 Waschschriffen in PBST wurden die Embryos für 12 min in 5 µg/ml Proteinase K inkubiert. Es folgten 10 min Waschen in 2 mg/ml Glyzin und 2 x 5 min Waschen in PBST, bevor die Embryos anschließend 20 min in einer Lösung aus 4 % PFA mit 0,2 % Glutaraldehyd fixiert wurden. Nach 2 x 5 min Waschen in PBST wurden die Embryos für mindestens 1 h bei 70 °C in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Danach wurde die Prä-Hybridisierungslösung durch die Hybridisierungslösung ersetzt, welche die markierte RNA-Sonde enthielt. Die Embryos wurden darin über Nacht bei 70 °C unter Schütteln inkubiert.

Tag 2: Waschen, Blocken und Antikörperfärbung

Nach Abziehen der Hybridisierungslösung wurden die Embryos in Lösung I überführt und in dieser 3 x für jeweils 30 min bei 70 °C gewaschen. Darauf folgten drei Waschschriffe in Lösung III für jeweils 30 min bei 65°C. Nach 3 x 5 min Waschen in TBST wurden unspezifische Bindestellen für die anti-Dig bzw. anti-FITC Antikörper durch Inkubation in 10%iger Schafserum-Lösung (in TBST) für 2,5 Stunden bei RT geblockt. Anschließend wurden die Embryos mit dem Antikörper (anti-Dig AP-Fab-Fragment oder anti-FITC AP-Fab-Fragment, 1:10.000; beide Roche Diagnostics) in 1%igem Schafserum in TBST über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tag 3: Waschen

Die Embryos wurden 3 x für 10 min, 5 x für 1 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4 °C in TBST auf einem Schüttler gewaschen.

Tag 4: Färbung

Zunächst wurden die Embryos dreimal für jeweils 10 min in NTMT-Lösung gewaschen und anschließend in 125 µg/ml BCIP und 250 µg/ml NBT (beides Sigma-Aldrich) in NTMT bei RT im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Zur Beendigung der Färbereaktion wurde nochmals 2 x 5 min

in NTMT gewaschen. Dann wurden die Embryos für mindestens 30 min in PBST, pH 5,5 überführt, anschließend in 4 % PFA nachfixiert und bei 4 °C gelagert.

Für eine zweite Farbreaktion wurden die Embryos nach der ersten Farbreaktion zunächst nicht nachfixiert, sondern aus dem PBST, pH 5,5 direkt in TBST überführt und für 2 x 5 min bei RT und anschließend für 30 min bei 72 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Behandlung führt zur Inaktivierung der durch die erste Farbreaktion im Gewebe vorhandenen AP. Nach erneutem Blocken der Embryos in 10 %iger Schafserum-Lösung (1 – 1,5 h) wurde nach Zugabe des Antikörpers gegen die zweite RNA-Sonde weiter nach dem Protokoll ab Tag 2 verfahren. Der Nachweis von hybridisierten Transkripten erfolgte hier nur mittels des Substrates BCIP, welche in einer intensiven Blaufärbung resultiert und dadurch von der dunklen blau-violetten Färbung der ersten Farbreaktion gut zu unterscheiden ist. Abschließend wurden die Embryos in 4 % PFA nachfixiert und bei 4 °C gelagert.

Im Falle einer Zweitfärbung zum Nachweis des GFP-Proteins wurden die Embryos nach der Hitzeinaktivierung 3 x 10 min in PBS + 10% FCS + 1% Triton X-100 gewaschen. Anschließend wurden die Embryos in die Antikörperlösung überführt und für 4 Tage bei 4 °C inkubiert (α -GFP: 1:1000; in PBS + 10% FCS + 1% Triton X-100). Anschließend wurde 6 x in PBS + 10% FCS + 1% Triton X-100 gewaschen, die Embryos wurden dann in die Antikörperlösung mit dem Zweitantikörper überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert (α -rb-HRP 1:1000). Nach der Inkubation wurden die Embryos in 100 mM Tris pH 7,4 überführt, welches mit 4 Tropfen DAB-Substrat versetzt war. Die DAB-Färbereaktion wurde nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt (*Peroxidase Substrate Kit, DAB, Vektor Laboratories, Burlingame, USA*).

2.2.4.3 RNA *in situ* Hybridisierung an Vibratomschnitten

Die *in situ* Hybridisierung wurde an schwimmenden Vibratomschnitten nach einem Standardprotokoll von D. Engelkamp und Kollegen (1999) durchgeführt.

Tag 1: Prähybridisierung und Hybridisierung

Die dehydrierten Vibratomschnitte wurden zunächst über eine absteigende Methanolreihe (75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBST) wieder rehydriert und für 10 min mit 6 % Wasserstoffperoxid in PBST gebleicht. Nachdem die Schnitte 2 x 5 min in PBST gewaschen waren, wurden sie in 200 μ l Prähybridisierungslösung für 4 – 5 h bei 68 °C inkubiert. Während der Prähybridisierung wurde die RNA-Probe im Hybridisierungspuffer gelöst und für 5 – 10 min bei 70 °C denaturiert. Die Prähybridisierungslösung wurde dann gegen 120 μ l RNA Hybridisierungslösung ersetzt und es folgte eine Inkubation ü/N bei 68 °C.

Tag 2: Waschen, Blocken und Antikörperinkubation:

Die Hybridisierungslösung wurde entfernt und die Schnitte wurden 2 x 10 min und 2 x 30 min mit SSC (1x) und anschließend 2 x 30 min mit SSC (0,2x) bei 68 °C gewaschen. Nachdem die Schnitte auf RT heruntergekühlt und 3 x 10 min in TBST gewaschen waren, wurden sie mit 10 % Schafserum in TBST für 3 h bei RT geblockt. Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Dig-Antikörper (1:2000 anti-Dig AP-Fab-Fragment in 1 % Schafserum in TBST) inkubiert.

Tag 3: Waschen

Die Schnitte wurden bei RT 2 x 10 min, dann 4 x 1 h und schließlich über Nacht bei 4 °C in TBST (auf einem langsam rotierenden Schüttler) gewaschen.

Tag 4: Färbung, Nachfixierung und Eindeckeln:

Nachdem die Schnitte 2 x 10 min mit NTMT gewaschen waren, wurde das NTMT durch 300 µl NBT/BCIP Färbelösung ersetzt. Die Farbreaktion erfolgte im Dunkeln bei RT auf dem Schüttler. Nach Abschluss der Farbreaktion wurden die Schnitte zunächst 2 x 10 min mit NTMT und anschließend in PBST (pH 3 – 4) für mindestens 30 min (bei 4 °C bis zu 3 Tagen) gewaschen. Die Nachfixierung der Schnitte erfolgte in 4 % PFA und 0,1 % Glutaraldehyd für 1 h bei RT. Anschließend wurde für 1 h in PBS (pH 6,3) gewaschen. Die Schnitte wurden dann auf Objektträger überführt, mit Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach mindestens einem Tag der Aushärtung wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet und bis zur Auswertung im Dunkeln gelagert.

2.2.5 Gefrierschnitte

In PFA (4 %) fixierte Embryos wurden über Nacht in 30 % Sukrose (in 1x PBS) bei 4 °C inkubiert. Die Embryos wurden in Einbettmedium (Leica, Nussloch) eingebettet, entsprechend ausgerichtet und auf einen Kryostatblock bei -18 °C aufgefroren. Es wurden 14 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost Objektträgern (Menzel Gläser, Braunschweig) gesammelt. Die Schnitte wurden bei RT getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Vibratomschnitte

In PFA (4 %) fixierte Embryoköpfe wurden 10 min in 1x PBS gewaschen und ggf. für 5 min in Glutaraldehyd vorfixiert. Unmittelbar vor dem Einbetten wurden 166 – 250 µl kaltes 25%iges Glutaraldehyd zu 2 – 3 ml BSA-Gelatine-Mix gegeben, schnell vermengt und zusammen mit den Embryoköpfen in eine Einbettform (*Resin Embedding Moulds*, 12 mm x 12 mm x 5 mm von Agar

Scientific LTD, Plano) gegeben. Nachdem der Block ausgehärtet war (10 – 20 min), wurde er mit Hilfe einer Rasierklinge zurechtgeschnitten und mit Sekundenkleber am Vibratomblock befestigt. Das Vibratombad wurde mit eiskaltem PBS gefüllt. Die Dicke der Schnitte variierte zwischen 60 – 100 μm (Einstellungen des Vibratoms: Geschwindigkeit: 6; Frequenz: 3 – 4). Die Schnitte wurden in 24er „*multi well*“ Platten in PBST aufgenommen und durch eine ansteigende Methanolreihe mit 25 %, 50 %, 75 % in PBST und zweimal in 100 % Methanol dehydriert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die dehydrierten Schnitte bei -20 °C gelagert.

2.2.7 Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten

Zunächst wurden die bei -20 °C gelagerten Gefrierschnitte bei RT aufgetaut und mit einem Fettstift umrandet. Nach mehrmaligem Waschen in PBS folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (AK), verdünnt in 5 % Chemiblocker mit 0,5 % Triton X-100, über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 10 min folgte die Inkubation mit einem geeigneten sekundären AK (in 5 % Chemiblocker mit 0,5 % Triton X-100) für 1 h bei RT. Die Schnitte wurden anschließend erneut 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Zellkerne angefärbt, wofür die Schnitte 10 min mit einer 1:4000 verdünnten DAPI-Lösung (in PBS) inkubiert wurden. Abschließend wurden die Präparate 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Nach Beendigung der Färbeprozedur wurden die Schnitte mit Aqua Poly/Mount eingedeckelt. Die Immunfärbung von Neurofilamenten an ganzen Mittelhirnen erfolgte nach einem Protokoll von Kardon (1998).

2.2.8 Biochemische Arbeitstechniken

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis ausgeführt. Zentrifugationsschritte und Inkubationen erfolgten standardmäßig bei 4 °C.

2.2.8.1 Herstellen von Proteinextrakten

Tektum- und Augenanlagen von Hühnchenembryos der Stadien HH 14 – 19 (E 2,5 – 3), wurden in kaltem PBS heraus präpariert und direkt in ein Eppendorfgefäß auf Eis überführt. Das Gewebe wurde entweder direkt weiter verwendet oder kurz abzentrifugiert, um das PBS zu entfernen und bei -70 °C gelagert. Die Isolierung der Proteine wurde in zwei Schritten mit zwei verschiedenen zusammengesetzten Pufferlösungen durchgeführt, so dass die Isolierung einer zytoplasmatischen und einer nukleären Fraktion möglich war. Das Gewebe wurde zunächst in Puffer A⁺ aufge-

nommen und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Menge des Puffers war abhängig von der Menge des Gewebes; im Normalfall wurden 300 µl eingesetzt. Nach 5 min Inkubation des Homogenats auf Eis wurde eine entsprechende Menge 10%iges Igepal (in H₂O) hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 % Igepal vorlag. Das Homogenat wurde nun für ca. 5 sek gevortext. Die Zugabe des Igepals und das kurze Vortexen führt zum Platzen der Zellen, wobei die zytoplasmatischen Proteine freigesetzt werden, die Kerne jedoch intakt bleiben. Die Kerne wurden anschließend durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm sedimentiert und der Überstand als zytoplasmatische Fraktion auf Eis aufbewahrt. Das Sediment wurde dann in Puffer B⁺ aufgenommen (180 µl bei 300 µl Puffer A⁺) und für 15 min auf dem Rundschüttler inkubiert. Der hohe Natriumchloridgehalt in Puffer B⁺ (400 mM NaCl) führt zum osmotisch bedingten Aufbrechen der Zellkerne, wodurch die nukleären Proteine freigesetzt werden. Zelluläre Überreste wurden anschließend durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 min sedimentiert und der Überstand als nukleäre Fraktion auf Eis aufbewahrt. Wurden anschließend die Proteinkonzentrationen (Nanodrop) vermessen, so lag die Konzentration der zytoplasmatischen Fraktion bei ungefähr 20 µg/µl und die der nukleären Fraktion bei ungefähr 0,7 µg/µl. Meist wurde jeweils ein Teil der Lysate (10 – 15 µl) abgenommen und für die Analyse mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Lysate wurden standardmäßig direkt im Anschluss für Protein-Protein-Interaktionsstudien weiter verwendet, wobei hierfür die beiden Fraktionen vereinigt wurden. Die Menge der beiden Puffer A⁺ und B⁺ wurde im Vorfeld so gewählt, dass die Endkonzentration an Salz im Gesamtlisat 145 mM betrug, was einer physiologischen Salzkonzentration von Geflügelzellen entspricht (3:1,8).

2.2.8.2 GST-„Pull-Down“

Der GST-„Pull-Down“ ist eine weit verbreitete Methode, um Interaktionen zwischen Proteinen zu untersuchen. Hierfür wird die kodierende Sequenz eines Proteins an die kodierende Sequenz des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert und als Fusionsprotein bakteriell in großen Mengen exprimiert. Durch die hohe Affinität des Enzyms zum Substrat Glutathion können GST-Fusionsproteine reversibel an eine feste Glutathionmatrix (Glutathion-Sepharose Kügelchen; Glutathione Sepharose™ 4B, GE Healthcare) gekoppelt werden. Die so immobilisierten GST-Fusionsproteine dienen dann als „Köder“ um Interaktionspartner des an GST-fusionierten Proteins aus Proteinlysaten zu isolieren.

2.2.8.2.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Expression: 5 ml LB-Medium (mit Ampizillin, Tetrazyklin und Chloramphenicol) wurden mit einer transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die 5 ml

Übernachtskultur wurde dann zu 200 ml LB-Medium^{amp, tet, chlo} gegeben und bei 37 °C auf eine OD₆₀₀ von 0,7 – 0,9 herangezogen. Nachdem die Kultur dann auf ca. 25 °C abgekühlt worden war, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (Sigma) in einer Endkonzentration von 0,2 mM induziert. Die Kultur wurde für 20 h bei ca. 25 °C unter Rühren inkubiert, anschließend auf 50 ml Gefäße aufteilt und für 20 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden bei -20 °C gelagert.

Aufreinigung: Das Pellet von 50 ml induzierter Bakterienkultur wurde in 1 ml kaltem PBS⁺ (+ enthielt Complete™ Protease Inhibitor Tablette) gut resuspendiert und anschließend zum Aufbrechen der Bakterien für 30 – 40 sek ultraschallbehandelt (Stärke: 4, 50 % Zyklen). Nach Zugabe von 50 µl einer 20%igen TritonX-100 Lösung (Endkonzentration: 1 %) wurde die Bakteriensuspension für 30 min auf einem Rundschüttler inkubiert. Um die festen Zellbestandteile vom Lysat zu trennen, folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 11.000 rpm. Das Bakterienlysat wurde dann in 200 µl Aliquots aufgeteilt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Zum Aufreinigen der GST-Fusionsproteine wurden zunächst 200 µl (auf Eis aufgetaut) Bakterienlysat zu 30 µl Glutathion-Sepharose-Kügelchen gegeben, welche vorher zweimal in PBS⁺ gewaschen wurden, und für 2 h auf dem Rundschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen mit den immobilisierten GST-Proteinen für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert, dann erst 2 x in PBS⁺ mit 0,5 % Triton X-100 und anschließend 2 x in BP⁺ Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils für 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die immobilisierten GST-Proteine wurden nicht gelagert, sondern standardmäßig direkt für ein „Pull-Down“-Experiment weiter verwendet. Für ein „Pull-Down“-Experiment wurden jeweils 30 µl Kügelchen mit immobilisierten GST-Proteinen eingesetzt. Zur Überprüfung der GST-Aufreinigung wurden 5 µl des Eluats nach einem Experiment separat auf ein Gel aufgetragen. Die GST-Fusionsproteine wurden anschließend über eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Gefärbt wurde für 3 h – über Nacht. Anschließend wurde das Gel mehrmals in Entfärberlösung gewaschen, zum Schluss in H₂O geschwenkt und schließlich getrocknet.

2.2.8.2.2 [³⁵S] - Markierung von Proteinen

Die *in vitro*-Transkription/Translation zur Herstellung [³⁵S]-Methionin-markierter Proteine wurde mittels des *TnT[®] - Coupled Reticulocyte Lysate Systems* (Promega) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dieses System ermöglicht die zellfreie Transkription und Translation eines DNA-Konstruktes in einem Reaktionsansatz. Eine Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein einer Bindestelle für eine der drei RNA-Polymerasen T3, T7 oder Sp6 stromaufwärts der zu transkribierenden DNA-Sequenz sowie eine Ribosomenbindestelle. Daher wurden DNA-Konstrukte, die für die *in vitro*-Transkription/Translation eingesetzt werden sollten, zunächst in geeig-

nete Vektoren, wie pSlax-flag, pBS KS+ und pCR II Topo kloniert. Um die Proteine während der Translation entsprechend zu markieren, enthielt die Reaktion eine Aminosäuremischung ohne Methionin und [^{35}S]-Methionin (*Perkin Elmer*, Waltham, MA USA) wurde hinzugefügt.

Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
TnT [®] - Kaninchen Retikulozyten Lysat	25 μl
TnT [®] - Reaktionspuffer	2 μl
TnT [®] -RNA-Polymerase (T3 oder T7) oder Sp6-RNA-Polymerase (Invitrogen)	1 μl
Aminosäure-Mix Minus Methionin (1 mM)	1 μl
[^{35}S]-Methionin (10 mCi/ml)	2 μl
RNAseOut Inhibitor (Invitrogen)	1 μl
DNA	1 μg
Nuklease-freies H ₂ O (Invitrogen)	auf 50 μl

Der Reaktionsansatz wurde für 90 – 100 min bei 30 °C inkubiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden zunächst direkt in einem GST-„Pull-Down“ Versuch eingesetzt. Danach wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.8.2.3 GST-„Pull-Down“-Experimente aus nativem Gewebe

Entsprechende Mengen Proteinlysate aus embryonalem Hühnchengewebe wurden wie unter 2.2.8.1 beschrieben hergestellt. Für einen Versuch wurden standardmäßig 480 μl Proteinlysate hergestellt. Das Lysat wurde zunächst mit 30 μl Sepharose-Kügelchen ohne GST-Fusionsprotein für 30 min – 1 h auf dem Rundschtüttler präinkubiert. Damit wurde überprüft, ob Proteine unspezifisch an die Glutathion-Sepharose-Matrix binden können. Und zudem wurden so Proteine, die unspezifisch an die Matrix binden und damit das Versuchsergebnis verfälschen würden, vor Zugabe der GST-Fusionsproteine aus dem Proteinlysate entfernt. Nach der Präinkubation wurden jeweils 10 – 15 μl Lysat als Kontrolle für die eingesetzte Proteinmenge („Input“ Kontrolle) abgenommen und mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Lysat wurde nun auf zwei Versuchsansätze aufgeteilt, mit je 30 μl der jeweiligen immobilisierten GST-Proteine vermischt und für 2 h auf dem Rundschtüttler inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen für 3 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden wieder jeweils 10 – 15 μl abgenommen und als Überstandkontrolle in 2x SDS aufgenommen. Anschließend wurden die präzipitierten Proteinkomplexe insgesamt 5 x mit je 500 – 1000 μl BP⁺ Puffer gewaschen (zwischen den Waschschritten wurde für 1 min bei 2000 rpm, nach dem letzten Schritt für 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert). Hierbei wurden die Kügelchen aus dem Präinkubationsschritt separat auch mitgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurden 15 μl als Waschkontrolle abgenommen und mit 2x SDS versetzt. Die gewaschenen Kügelchen wurden dann mit je 20 μl 1x SDS Probenpuffer versetzt und alle Proben wurden bis zur Analyse bei -20 °C

gelagert. Im Falle einer DNase I Behandlung wurden die Lysate entweder direkt vor dem Einsatz in einen GST-„Pull-Down“-Experiment für 15 min bei 37 °C mit 30 U DNase I (Roche Diagnostics) inkubiert, oder es wurde vor dem Waschen ein Teil der Kügelchen abgenommen, welche dann einer DNase I Behandlung unterzogen wurden.

2.2.8.2.4 GST-„Pull-Down“ Experimente mit [³⁵S]-markierten Proteinen

Für ein „Pull-Down“ Experiment mit einem radioaktiv markierten, *in vitro* translatierten Protein, wurden 230 µl BP⁺ Puffer mit 10 – 15 µl der *in vitro* Reaktion vermengt. Anschließend wurde im Experiment wie unter 2.2.8.2.3 beschrieben weiter verfahren, mit dem Unterschied, dass die Proben in diesen Fall in 4x LDS Puffer (Invitrogen) aufgenommen wurden. Die Elektrophorese wurde mit vorgefertigten 12%igen Bis-Tris Gelen (Invitrogen) in MOPS- oder MES Puffer (abhängig von der Größe der erwarteten Proteine; beide Invitrogen) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele direkt in die Fixierlösung überführt und für 10 – 30 min bei RT geschwenkt. Die fixierten Gele wurden anschließend auf ein zugeschnittenes Whatman-Papier gelegt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und für 1 – 3 h mittels eines Vakuumtrockners getrocknet. Die getrockneten Gele wurden dann in eine Gelkassette gelegt, ein Röntgenfilm wurde aufgelegt und die Gelkassette wurde für 3 h – 7 Tage bei -70 °C gelagert.

2.2.8.3 Ko-Immunopräzipitation aus nativem Gewebe

Proteinlysate aus Gewebe wurden wie unter 2.2.8.1 beschrieben hergestellt. Zunächst wurden die Lysate für 30 min – 1 Stunde mit 30 µl nativen ProteinG-Agarose-Kügelchen (Roche Diagnostics, zuvor zweimal in Puffer BP⁺ waschen) auf einem Rundschtüttler präinkubiert. Dadurch wurden Proteine, die unspezifisch an ProteinG-Agarose binden, aus dem Proteinlysat entfernt. Um eine mögliche unspezifische Bindung von Proteinen an die Kügelchen zu untersuchen, wurden die mit dem reinen Lysat inkubierten Kügelchen 5 x in BP⁺ Puffer gewaschen, in 15 µl 1x SDS Puffer aufgenommen und durch SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis analysiert. Die Kügelchen wurden abzentrifugiert, um die Lysate in neue Eppendorfgefäße überführen zu können. Den Lysaten wurde nun der Antikörper zugegeben und es folgte eine Inkubation über Nacht auf dem Rundschtüttler. Um die entstandenen Antikörper-Proteinkomplexe zu binden, wurden nun 20 µl gewaschene Protein-G Agarose Kügelchen hinzugefügt und es folgte eine weitere Inkubation auf dem Rundschtüttler für 4 h. Anschließend wurden die gebundenen Proteinkomplexe durch Zentrifugation für 3 min bei 2000 rpm pelletiert und 5x in BP⁺ Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Proteinkomplexe in 15 µl 1x SDS Puffer aufgenommen und

bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen an den Antikörper wurde hier ein Ansatz mit einem anderen nicht relevanten Antikörper gewählt.

2.2.8.4 SDS-PAGE

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen Tris-Glyzin SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970) entsprechend ihrer Molekulargewichte auftrennt. SDS, ein anionisches Detergenz, führt zur Denaturierung von Proteinen, indem es sich an die Primärstruktur der Polypeptide anlagert. Aufgrund der negativen Ladung von SDS werden so die strukturbedingten Eigenladungen der Proteine maskiert und die Proteine erhalten eine uniforme negative Ladung, die proportional zu ihrer jeweiligen molekularen Masse ist. In Anwesenheit von SDS wandern daher alle Proteine in einem elektrischen Feld in Richtung Anode. Ihre Migrationsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von ihrer molekularen Größe und der Vernetzungsdichte der Polyacrylamidmatrix. Die diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet zwei Gel-Systeme mit unterschiedlichen pH-Werten. Die Trennung der Proteine erfolgt im Trenngel (pH 8,8). Zuvor verursacht jedoch der niedrigere pH-Wert im Sammelgel (pH 6,8), dass das Glyzin als Zwitterion vorliegt. Zwischen dem langsameren Glyzin und dem schneller beweglichen Chlorid entsteht so ein zusätzliches Dipolfeld, das einen nahezu gleichzeitigen Eintritt der aufgetragenen Proteine in das Trenngel ermöglicht und somit für eine höhere Bandenschärfe sorgt.

Zusammensetzung eines 12%igen Tris-Glyzin Gels (Minigel, 4,5 x 7,5 cm, Schichtdicke 0,75 mm):

Komponente	Trenngel (in ml)	Sammelgel (in ml)
H ₂ O	1,55	2,27
Lower Tris (1 M, pH 8,8)	1,9	-
Upper Tris (1 M, pH 6,8)	-	0,375
Acrylamid (40 %)	1,5	0,3
SDS (10 %)	0,05	0,02
TEMED	0,005	0,003
APS (10 %)	0,025	0,03

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im Tris-Glyzin Gelsystem erfolgte im Laemmli-Laufpuffer. Zunächst wurde eine Spannung von 50 V angelegt, bis sich die Lauffront am unteren Rand des Sammelgels gesammelt hatte. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte anschließend bei einer Spannung von 100 – 120 V. Alternativ wurde die kontinuierliche SDS-PAGE unter Verwendung vorgefertigter Gelsysteme (Invitrogen) verwandt. Hierfür wurden sowohl das Bis-Tris-Gelsystem mit entsprechenden MOPS oder MES-Puffer und das Tris-Acetat-Gelsystem mit dem entsprechenden Laufpuffer herangezogen. Für das Bis-Tris-System wurde eine

kontinuierliche Spannung von 200 V verwendet für das Tris-Acetat-System eine kontinuierliche Spannung 150 V. Die Proben wurden vor dem Auftragen entweder für 5 min bei 95 °C oder im Fall von *in vitro* translatierten Proteinen für 20 min bei 65 °C erhitzt, kurz gevortext, dann abzentrifugiert und schließlich in die Geltaschen pipettiert.

2.2.8.5 Proteintransfer („Western Blot“) und Immundetektion

Der Nachweis von Proteinen, die nicht radioaktiv markiert waren, erfolgte über Immundetektion nach elektrophoretischem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Millipore) durch das „Western Blot“ Verfahren. Bei Tris-Glyzin Gelen wurde der Transfer mittels der „Semidry“ Methode (BioRad, München) bei vorgefertigten Bis-Tris oder Tris-Acetat Gelen mit Hilfe des „XCell Blot“ Moduls (Invitrogen) durchgeführt. Hierzu wurden Tris-Glyzin Gele nach der Gelelektrophorese zunächst für 5 min in Transferpuffer geschwenkt. Dann wurden drei Lagen zugeschnittene, zuvor in Transferpuffer getauchte Whatman-Filterpapiere auf die „Semidry“ Apparatur gelegt. Darauf folgte die Membran, die kurz zuvor in Methanol hydrophilisiert, anschließend kurz in H₂O abgewaschen und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert wurde. Auf die Membran wurde nun das Gel gelegt und es folgten weitere fünf Lagen Filterpapier. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm³ für 1 h. Der Transfer bei vorgefertigten Gelen wurde nach Anweisung des Herstellers in Tris-Glyzin oder Tris-Acetat Transferpuffer durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in H₂O gewaschen, standardmäßig für 30 sek in PonceauS-Färbelösung getaucht und anschließend mit H₂O gewaschen, um die transferierten Banden sichtbar zu machen. Nachdem das PonceauS durch TBST abgewaschen war, wurde die Membran in Blocklösung gegeben und für 1 h bei RT geschwenkt.

Die Immundetektion erfolgte direkt im Anschluss an das Blocken, abhängig vom verwendeten primären AK, für 2 h bei RT bis über Nacht bei 4 °C. Der Inkubation folgten drei 10minütige Waschschrte in TBST, um die Membran anschließend mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären AK für 1 h bei RT zu inkubieren. Primäre sowie sekundäre AK wurden standardmäßig in 3 % BSA in TBST verdünnt. Nach Inkubation mit dem sekundären AK wurde die Membran für 10 min in TBST, anschließend 3 x 10 min in TBS gewaschen. Die Peroxidaseaktivität wurde dann durch eine 5minütige Inkubation mit den ECL Reagenzien (Amersham) und durch Detektion der Chemilumineszenz auf Biomax MR-1 Röntgenfilmen (Kodak) visualisiert.

Um die gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran zunächst 2 x 5 min in TBST gewaschen und anschließend in „Stripping Buffer“ überführt. Nun wurde die Membran für 30 – 60 min bei 55 °C unter Schwenken inkubiert. Zum „Strippen“ der Membran, also zum Entfernen der Antikörper, wurde eine milde Methode gewählt, indem die gebundenen Antikörper durch den niedrigen pH von 2,5 in der Lösung von der Membran gelöst wurden.

Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min in TBST gewaschen und erneut für 30 min und nicht länger als 60 min in Blocklösung geblockt und für eine weitere Immundetektion verwendet.

2.2.8.6 GST-„Pull-Down“ Experimente für die Massenspektrometrie

Die Herstellung der Proteinlysate und die Durchführung der GST-„Pull-Down“-Experimente erfolgten wie zuvor beschrieben (Kap. 2.2.8.1 und 2.2.8.2). Für die Massenspektrometrie wurde jedoch das Zehnfache an Gewebe eingesetzt. Als Kontrolle für die Spezifität der Interaktion eines Proteins mit Meis2 wurde, wie bei allen „Pull-Down“-Experimenten in dieser Arbeit, ein Experiment nur mit immobilisiertem GST durchgeführt. Die Elution der an die Kügelchen gebundenen Proteine und Komplexe erfolgte hier in 2 – 3 Schritten, 2 x in Glutathion-Elutionspuffer und zuletzt in 1x SDS-Probenpuffer. Die Elutionen wurden anschließend vereinigt.

SDS-PAGE:

Um eine bessere Auftrennung der Proteinbanden zu erreichen, wurden die Proben, die für die Massenspektrometrie eingesetzt werden sollten, auf einem präparativen 20 x 20 cm großen, 0,75 mm dicken Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Komponente	10 % Trenngel (ml, Ges.25 ml)	4 % Sammelgel (ml, Ges. 5ml)
H ₂ O	11,6	3,83
Trenngelpuffer (4x)	6,8	-
Sammelgelpuffer (8x)	-	0,63
Acrylamid (40 %)	6,3	0,5
TEMED	0,010	0,005
APS (10 %)	0,25	0,05

Zunächst wurde das Trenngel angesetzt und langsam in die Gelapparatur gegeben. Das Trenngel wurde zum auspolymerisieren für 1 h mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Isopropanol abgenommen, der obere Rand des Trenngels 2 x mit H₂O gewaschen und schließlich über Nacht mit Sammelgelpuffer (ohne SDS) überschichtet. Dann wurde das Sammelgelpuffer abgenommen und das Trenngel mit 5 ml Sammelgel überschichtet und für 1 h auspolymerisieren lassen. Es wurden 60 – 80 µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte im Laemmli-Laufpuffer bei 35 mA (Sammelgel: 100 V; Trenngel: 350 V) für ca. 7 h. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurde das System während der gesamten Gelelektrophorese durch eine Kühlapparatur bei einer konstanten Temperatur von 13 °C gehalten.

Silberfärbung:

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteinbanden im Gel über eine Silberfärbung nach Anweisungen des Herstellers sichtbar gemacht („Silver Stain Plus Kit“,

BioRad). Dazu wurde das Gel direkt im Anschluss an die Elektrophorese in Fixierlösung (50 % Methanol, 10 % Eisessig, 10 % „*Fixative enhancer*“ Konzentrat, 30 % H₂O) überführt und für 20 min schüttelnd inkubiert. Nachdem das Gel dann 2 x 10 min in H₂O gewaschen worden war, wurde das Gel in die Färbelösung überführt. Für ein 20 x 20 cm großes, präparatives Gel wurden 200 ml Färbelösung wie folgt angesetzt:

10 ml „Silver Complex Solution“
 10 ml „Reduction Moderator Solution“
 10 ml „Image Development Reagent“
 unter Rühren zu 70 ml H₂O geben

Unmittelbar vor der Färbung wurde die auf RT äquilibrierte „*Development Accelerator*“ Lösung unter schnellem Rühren mit der Färbelösung verrührt und auf das Gel gegeben. Die Färbereaktion dauerte 10 – 15 min und wurde durch eine 5%ige Eisessig-Lösung gestoppt. Nach erneutem Waschen in H₂O wurde das Gel in eine Klarsichtfolie gehüllt und mit Hilfe eines Scanners dokumentiert. Während der gesamten Färbeprozedur wurde mit Schutzbekleidung und Handschuhen gearbeitet, um Verunreinigungen des Gels zu vermeiden. Silbergefärbte Banden, die nur im Experiment, nicht jedoch in den Kontrollen zu sehen waren, wurden mit Hilfe einer sterilen Einwegklinge ausgeschnitten und bis zur Analyse durch die Massenspektrometrie bei -20 °C gelagert.

2.2.9 Luziferase-Reporteranalysen

Für *in vitro* Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren wurde ein GAL4 (Galaktosidase 4)-abhängiges Luziferasereportersystem herangezogen. Hierfür wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, welches vier hintereinander liegende Bindestellen für die GAL4-DNA-Bindedomäne trägt (siehe Tab. 8). Diesen Bindestellen ist das Gen für das Enzym *Firefly*-Luziferase nachgeschaltet. Durch Fusion eines beliebigen Proteins mit der GAL4-DNA-Bindedomäne, kann dieser spezifisch die Expression der *Firefly*-Luziferase regulieren. So lässt sich die transkriptionelle Aktivität eines GAL4-Fusionsproteins anhand der exprimierten Menge an Luziferase bestimmen. Die exprimierte Menge an Luziferase kann anhand ihrer Lumineszenz-erzeugenden, enzymatischen Aktivität ermittelt werden.

Zellen der NIH3T3-Linie wurden bei 70 – 90 %iger Dichte mit Lipofectamine 2000 Reagenz (Invitrogen) mit den verschiedenen Konstrukten nach Anweisungen der Hersteller in 24-well Platten transfiziert. Es wurden jeweils insgesamt 800 ng DNA mit 2 µl Lipofectamine in 100 µl Optimem-Medium transfiziert. Davon waren 300 ng des *Luziferase*-Reporterkonstruktes und 50 ng eines *Renilla*-Konstruktes als Referenz für die Transfektionseffizienz (siehe Tab. 8). Den kurz vor der Transfektion mit 500 µl Optimem versetzten Zellen wurde das DNA/Lipofectamine-Gemisch

hinzugegeben und 5 h bis über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Transfektionsmedium wurde anschließend durch Wachstumsmedium ersetzt und die Zellen wurden bis 48 h nach Transfektion inkubiert.

Für die Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die Zellen zunächst in 100 µl Trypsin/EDTA gelöst und mit 700 µl Wachstumsmedium versetzt. Davon wurden 200 µl in 96-well-Platten mit weißem Boden ausplattiert und nach 5 h Inkubation erfolgte die Messung der Lumineszenz mittels des „Dual Glo™ Luciferase Assay Systems“ (Promega) in einem 96-well Luminometer (Glomax, Promega) nach Anweisungen des Herstellers. Das System erlaubt die Aktivitätsmessung von zwei unterschiedlichen Luziferasen in der gleichen Probe. Die erste Messung bestimmt die Aktivität der *Firefly*-Reporterluziferase. Mit der zweiten Messung wird die Aktivität der *Renilla*-Luziferase gemessen. Ein Plasmid, in welchem das Gen für die *Renilla*-Luziferase einem TK-(Thymidin-Kinase)-Promotor nachgeschaltet ist, wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz stets ko-transfiziert. Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2002 (Microsoft, USA) ausgewertet. Dazu wurden zunächst die verschiedenen Werte der *Renilla*-Luziferase auf den höchsten *Renilla*-Wert im Experiment normiert. Anschließend wurden die gemessenen Werte der *Firefly*-Luziferase auf die normierte *Renilla*-Aktivität der jeweiligen Probe normiert, indem diese mit den entsprechenden *Renilla*-Werten dividiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines ungepaarten, beidseitigen Student'schen t-Tests. Hierbei galt ein Signifikanzniveau von 5 %.

3. Ergebnisse

Der TALE-Homeodomän-Transkriptionsfaktor *Meis2* weist während der Embryonalentwicklung von Vertebraten spezifische Expressionsmuster entlang des Neuralrohrs auf und übt dort entsprechend seiner Expressionsmuster wichtige Funktionen aus. Im anterioren Neuralrohr ist eine starke Domäne der *Meis2*-Expression im Mittelhirn. Bislang lieferten Untersuchungen im Rahmen meiner Diplomarbeit erste Erkenntnisse über eine neue Rolle von *Meis2* in der Entwicklung des Mittelhirns im Hühnchenembryo (Agoston, Diplomarbeit 2005). Daher war es in der vorliegenden Arbeit von Interesse, einen tieferen Einblick in die Funktion von *Meis2* in diesem Bereich des sich entwickelnden Nervensystems zu erlangen. Dazu wurden zunächst die *Meis2*-Expression und ihre Regulation im Mittelhirn näher charakterisiert, um anschließend über funktionelle Untersuchungen, im Besonderen auch in späteren Entwicklungsstadien des Embryos, mehr Aufschluss über die Rolle von *Meis2* zu erlangen. Biochemische Untersuchungen zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von *Meis2* im Mittelhirn und der Augenanlagen sollten außerdem weitere Erkenntnisse über die Funktionsweisen des Ko-Transkriptionsfaktors bringen.

3.1 Zeitliche und räumliche Expression von *Meis2* im anterioren Neuralrohr

Um einen ersten Hinweis auf die Funktion des Transkriptionsfaktors *Meis2* zu erlangen, wurde zunächst die zeitliche und räumliche Expression von *Meis2* während der Embryonalentwicklung untersucht. Im Laufe der Embryonalentwicklung des Hühnchens konnten erste *Meis2*-Transkripte bereits während der Neurulation in der anterioren Neuralplatte (HH 8; 8 Somiten) nachgewiesen werden (Heine et al., 2008). Parallel zur Ausdifferenzierung der fünf Hirnvesikel, zwischen Stadium HH 10 – 12, wurde *Meis2* im anterioren Neuralrohr stark und bereits in spezifischen Mustern exprimiert. Hier zeigte sich ab Stadium HH 10 zum einen eine starke Expression in den optischen Vesikeln, den Anlagen der neuralen Retina. Ab Stadium HH 11 konnte zusätzlich eine starke *Meis2*-Expression im Mesenzephalon nachgewiesen werden. Im posterioren (kaudalen) Bereich des Neuralrohrs grenzte die Expressionsdomäne an das Metenzephalon (Agoston, Diplomarbeit 2005). Im Mesenzephalon war die Domäne der *Meis2*-Expression von Beginn an einheitlich und klar zum anterior gelegenen Diencephalon und zum posterior gelegenen Metenzephalon abgegrenzt. Hier konnte auch im Bereich der isthmischen Einschnürung

keine Expression von *Meis2* nachgewiesen werden (Abb. 9A). Das spezifische Expressionsmuster von *Meis2* in den optischen Vesikeln und im Mesenzephalon konnte auch im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung im Stadium HH 15 beobachtet werden. Es war weiterhin eine starke Expressionsdomäne im Mesenzephalon erkennbar, die anterior an der di-mesenzephalischen Grenze, und posterior an der Grenze zur isthmischen Einschnürung endete. Eine weitere starke *Meis2*-Expression fand sich in diesem Stadium auch in der zukünftigen Retina und in der Linsenanlage (Abb. 9B).

In situ Hybridisierungen auf koronalen Vibratomschnitten erlaubten eine genauere Betrachtung der *Meis2*-Expression im Mittelhirn. Hier zeigte sich, dass im Hühnchen HH 15 *Meis2*-Transkripte vorwiegend im dorsalen Mittelhirn – im Bereich der Alarplatten – zu finden waren (Abb. 9C). Im Bereich der Basalplatten des ventralen Mittelhirns war in diesem Stadium hingegen nur eine sehr schwache Expression nachzuweisen. Im Stadium HH 19 fand sich eine klar abgegrenzte, starke Expressionsdomäne in den Alarplatten des Mittelhirns (Abb. 9D, Pfeile). Somit wird *Meis2* spezifisch in dem Bereich des Neuralrohrs exprimiert, aus welchem sich im weiteren Verlauf die optischen Tektata entwickeln. In den ventralen Basalplatten, den Anlagen des Tegmentums, war hingegen, mit Ausnahme einer paarig angelegten Gruppe von Zellen nahe der Bodenplatte, keine Expression von *Meis2* vorhanden. Zusätzlich konnten weder im Stadium HH 15 noch im Stadium HH 19 *Meis2*-Transkripte in der Dachplatte und der Bodenplatte des Mittelhirns nachgewiesen werden (Abb. 9C, D). In Mausembryonen des embryonalen Tages E 10,5, einem zum Hühnchenstadium HH 15 korrespondierenden Entwicklungsstadium, war *Meis2*-Expression in einem ähnlichen Muster wie im Hühnchen zu finden. Die Expression im dorsalen Mittelhirn war sehr stark, wohingegen in den Basalplatten kaum *Meis2*-Transkripte vorhanden waren. In der Maus war in der Bodenplatte und der Dachplatte des Mittelhirns ebenfalls keine *Meis2*-Expression zu erkennen (Abb. 9G).

Am embryonalen Tag 6,5 ist bereits eine beginnende Laminierung im Gewebe des optischen Tektums zu erkennen. Die *Meis2*-Expression war zu diesem Zeitpunkt im gesamten Bereich der optischen Tektata sehr stark. In drei Bereichen war hier jedoch eine besonders intensive Färbung zu erkennen (Abb. 9E). Bei E 8 und fortgeschrittener tektaler Laminierung konnten hingegen mehrere klar voneinander abgegrenzte Schichten mit unterschiedlich starker *Meis2*-Expression differenziert werden. Das optische Tektum besteht bei E 8 aus sechs definierten Laminae. Neben dem Neuroepithel, welches in diesem Stadium aufgrund einer hohen Zellmigration relativ dünn ist, haben sich zu diesem Zeitpunkt vier

tektale Laminae unterschiedlicher Zelldichte und Zellkomposition ausgebildet (Laminae i – iv, Abb. 9F). Den Abschluss bildet eine Oberflächenschicht, die so genannte piaie Oberfläche (LaVail und Cowan, 1971).

Im Neuroepithel war eine Expression von *Meis2* zu finden (Abb. 9F, ne). Die relativ breite Lamina i wird in eine äußere und eine innere Schicht aufgeteilt. *Meis2* wurde hier in der inneren Schicht stark exprimiert. In der äußeren Schicht konnte ebenfalls, jedoch eine schwächere *Meis2*-Expression nachgewiesen werden (Abb. 9F). Eine weitere starke Expression von *Meis2* fand sich E 8 in Lamina ii. Eine sehr schwache Expression konnte hingegen in einem Bereich, welcher sich vermutlich zwischen Lamina iii und iv befindet nachgewiesen werden. Schließlich war auch in der Oberflächenschicht des sich entwickelnden optischen Tektums eine intensive *Meis2*-Expression zu erkennen (Abb. 9F, p).

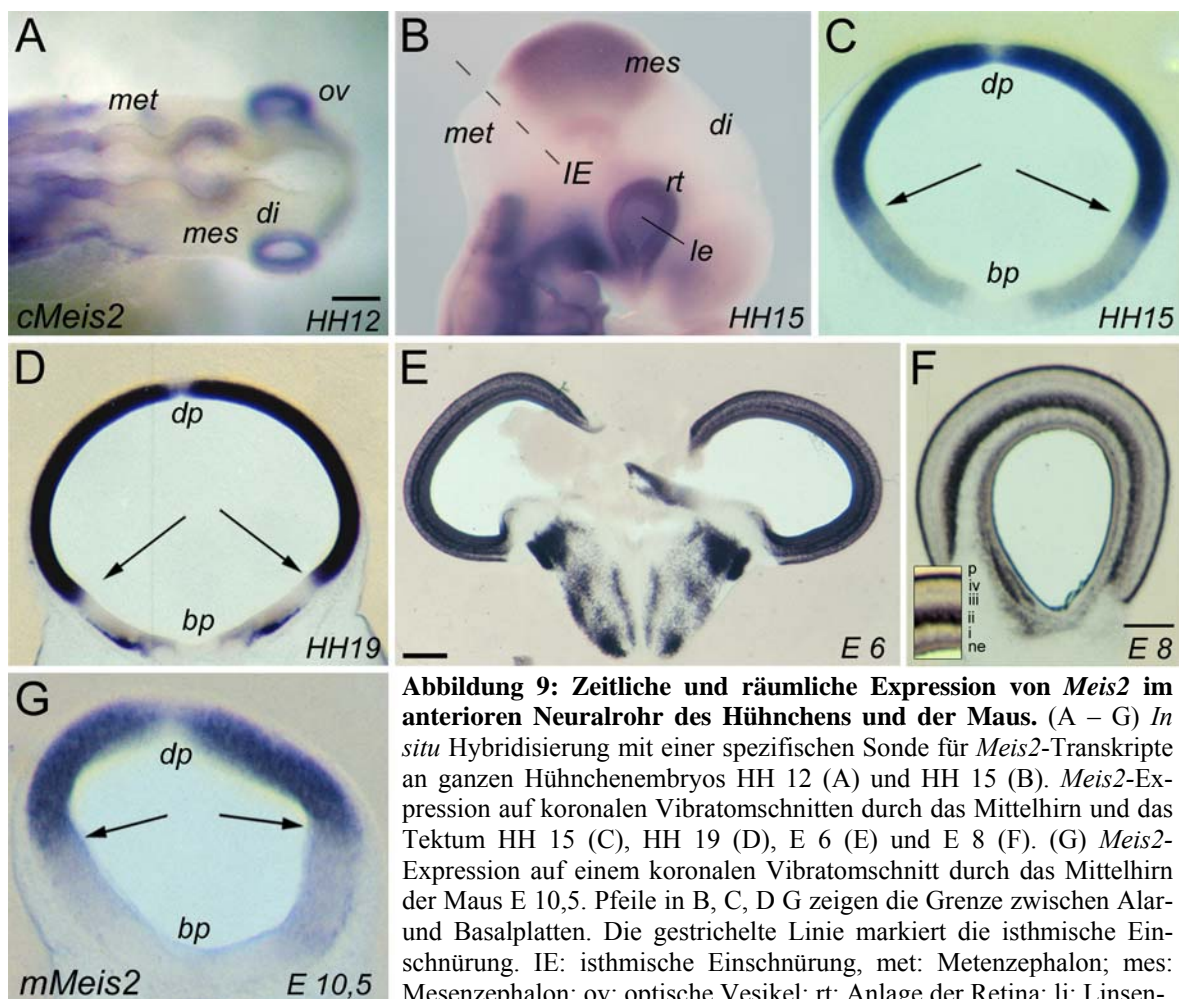


Abbildung 9: Zeitliche und räumliche Expression von *Meis2* im anterioren Neuralrohr des Hühnchens und der Maus. (A – G) *In situ* Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für *Meis2*-Transkripte an ganzen Hühnchenembryos HH 12 (A) und HH 15 (B). *Meis2*-Expression auf koronalen Vibratomschnitten durch das Mittelhirn und das Tektum HH 15 (C), HH 19 (D), E 6 (E) und E 8 (F). (G) *Meis2*-Expression auf einem koronalen Vibratomschnitt durch das Mittelhirn der Maus E 10,5. Pfeile in B, C, D G zeigen die Grenze zwischen Alar- und Basalplatten. Die gestrichelte Linie markiert die isthmische Einschnürung. IE: isthmische Einschnürung, met: Metenzephalon; mes: Mesenzephalon; ov: optische Vesikel; rt: Anlage der Retina; li: Linsen-anlage; di: Dienzephalon; dp: Dachplatte; bp: Bodenplatte; ne: Neuroepithel; p: piaie Oberfläche. Maßstab: A – D, G: 200 µm; E, F: 1 mm.

Das älteste in der vorliegenden Arbeit untersuchte Entwicklungsstadium im Hühnchen war E 13,5. Immunfluoreszenzfärbungen wiesen auch hier eine starke und auf bestimmte Schichten beschränkte *Meis2*-Expression im optischen Tektum nach (siehe Kap. 3.3.5, Abb. 19C). Während der Entwicklung des optischen Tektums bleibt die *Meis2*-Expression also über einen langen Zeitraum hinweg erhalten.

Anfangs noch in allen neuronalen Vorläuferzellen des dorsalen Mittelhirns exprimiert, bleibt die *Meis2*-Expression in den sich entwickelnden optischen Tekta zwar weiterhin stark. *Meis2* wird jedoch während der Entwicklung der tektum-charakteristischen Laminierung zunehmend auf bestimmte Laminae des optischen Tektums eingeschränkt.

3.2 Regulation der *Meis2*-Expression in der tektalen Anlage des Hühnchens

Wie die vorangegangene Expressionsstudie zeigte, wird *Meis2* im Mesenzephalon von Beginn an spezifisch im dorsalen mesenzephalischen Vesikel exprimiert. Das Expressionsmuster von *Meis2* weist also auf eine besondere Rolle des Transkriptionsfaktors bei der Entwicklung des optischen Tektums im Hühnchen hin.

Um zunächst einen Einblick in die Entstehung des spezifischen Expressionsmusters von *Meis2* zu erhalten, wurden Fehlexpressionsstudien mit Hilfe der *in ovo* Mikroelektroporation durchgeführt. Diese sollten klären, welchen regulatorischen Faktoren die *Meis2*-Expression im Mittelhirn unterliegt. Da die Expression von *Meis2* scharfe Grenzen zum umliegenden Gewebe aufweist wurde untersucht, ob Transkriptionsfaktoren und sezernierte Moleküle, welche in zur *Meis2*-Domäne benachbarten Regionen exprimiert werden, einen Einfluss auf die Expression von *Meis2* ausüben. Fgf8 ist ein sezerniertes Protein, welcher posterior der isthmischen Einschnürung exprimiert wird. Um den Einfluss von Fgf8 auf die Expression von *Meis2* zu untersuchen, wurde die vollständig kodierende Sequenz der Spleißvariante *Fgf8b* im mesenzephalischen Vesikel des Hühnchens HH 9 – 11 fehlexprimiert. Wie anschließende *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos mit einer spezifischen Sonde gegen *Meis2*-Transkripte deutlich machten, kam es 24 h nach Elektroporation von *Fgf8b* zu einer Reduktion der *Meis2*-Expression im Mittelhirn (Abb. 10A; Pfeil, n = 7). Die Reduktion war nicht nach Elektroporation eines *GFP*-Kontrollkonstruktes zu beobachten (Abb. 10B; n = 5). Das Vorhandensein des elektroporierten Konstruktes in der gewünschten Region des Neuralrohrs wurde mit Hilfe von koelektroporiertem *GFP* überprüft (Abb. 10C). Diese Versuche lassen vermuten, dass das

sezernierte Protein Fgf8 die Expression von *Meis2* direkt an der isthmischen Einschnürung bzw. im Hinterhirn unterdrückt.

Weitere Fehlexpressionsstudien zeigten, dass auch der Transkriptionsfaktor Pax6, der normalerweise im benachbarten Dienzephalon exprimiert wird (siehe Abb. 21), einen Einfluss auf die *Meis2*-Expression im Mittelhirn ausübt. Die Fehlexpression der kodierenden Sequenz von *Pax6* im Mittelhirn führte 24 h nach Elektroporation ebenfalls zu einer Unterdrückung der *Meis2*-Expression (Abb. 10D – E'; n = 11). Hier wurden mittels einer Doppel-*in situ* Hybridisierung zusätzlich zu *Meis2*-Transkripten auch *GFP*-Transkripte nachgewiesen (Abb. 10E'). Dies bestätigte das Vorhandensein der elektroporierten Konstrukte im Mittelhirn und ließ erkennen, dass die Reduktion von *Meis2* in den elektroporierten Bereichen erfolgte (Abb. 10E, E'). Pax6 unterdrückt also die Expression von *Meis2*, was die Vermutung nahe legt, dass auf diese Weise die di-mesenzephalare Grenze der *Meis2*-Expression entsteht.

Sonic Hedgehog (Shh), ein sezerniertes Molekül, wird während der Embryonalentwicklung in der Bodenplatte des gesamten Neuralrohrs exprimiert und in das benachbarte Gewebe sezerniert. Shh hat einen „ventralisierenden“ Einfluss auf das sich entwickelnde Neuralrohr. Es hemmt die Transkription dorsaler Markergene und induziert die Expression ventral-spezifischer Faktoren (Wilson und Maden, 2005). Um den Einfluss von Shh auf die Expression von *Meis2* zu untersuchen wurde die kodierende Sequenz von *Shh* mittels eines retroviralen Konstruktes fehlexprimiert. Die *Meis2*-Expression war 48 h nach Injektion von *Shh-RCAS(A)* von Flecken durchbrochen, die keine *Meis2*-Transkripte aufwiesen (Abb. 10F, F'; n = 9). Dies war nicht nach Infektion des Gewebes mit einem retroviralen *GFP*-Konstrukt zu beobachten. Hier waren keine Veränderungen der *Meis2*-Expression zu erkennen (Abb. 10H, H'; n = 3). Somit resultierte die Fehlexpression von *Shh* ebenfalls in einer Unterdrückung der *Meis2*-Expression im Mittelhirn. Das sezernierte Protein Shh ist also ein weiterer negativer Regulator der *Meis2*-Expression.

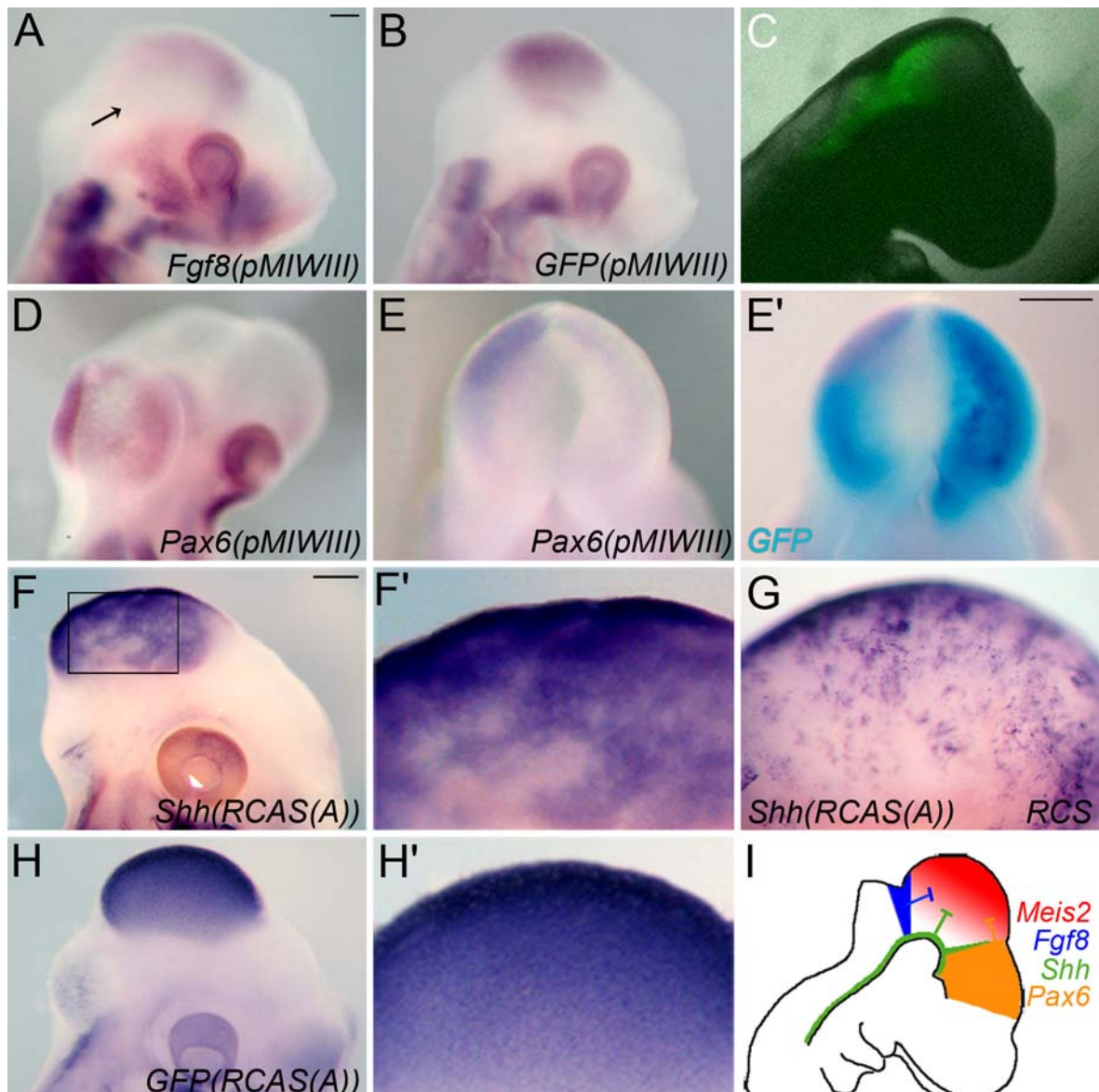


Abbildung 10: Regulation der *Meis2*-Expression im Mittelhirn des Hühnchens. *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos mit einer *Meis2*-spezifischen Sonde 24 h nach Überexpression von *Fgf8-pMIWIII* (A), *GFP-pMIWIII* (B) und *Pax6-pMIWIII* (D – E') und 48 h nach Injektion von *Shh-(RCAS (A))* (F, F') oder *GFP-(RCAS(A))* (H, H'). (E, E') Rückansicht eines Embryos 24 h nach Fehlexpression von *Pax6-pMIWIII*. (C) zeigt die GFP-Fluoreszenz zur Kontrolle der Elektroporation. (E') Doppel-*in situ* Hybridisierung mit einer *Meis2*-spezifischen Sonde und einer *GFP*-Sonde zum Nachweis des elektroporierten Bereiches. (F', H') Vergrößerte Ausschnitte der Embryos in F und H. (G) *In situ* Hybridisierung mit einer *RCS*-Sonde zum exemplarischen Nachweis der Virusinfektion durch *Shh-(RCAS (A))*. (I) Schematische Darstellung der *Meis2*-Regulation im Mittelhirn des Hühnchens. Die *Meis2*-Expression (rot) wird durch *Fgf8* am isthmischen Organisator (blau), durch *Pax6* im Dienzephalon (orange) und durch *Shh* im ventralen Mittelhirn (grün) unterdrückt. Maßstab: A – D: 200 μ m; E, E': 200 μ m; F,H: 500 μ m.

Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass die Expression von *Meis2* im Mittelhirn einer strengen negativen Regulation durch Transkriptionsfaktoren und sezernierten Faktoren, welche in benachbarten Regionen exprimiert werden, unterliegt. Gemeinsam formen diese Faktoren das Expressionsmuster von *Meis2* im Mittelhirn und bewirken, dass

Meis2 in diesem Bereich des Neuralrohrs ausschließlich im dorsalen Mittelhirn exprimiert werden kann (Abb. 10I).

3.3 Funktion von *Meis2* bei der Entwicklung des Tectum opticum

Um im Folgenden zu untersuchen, ob *Meis2* entsprechend seines spezifischen Expressionsmusters eine besondere Funktion bei der Entwicklung des optischen Tektums einnimmt, wurden zunächst eine Reihe von Überexpressions- und Fehlexpressionsstudien durchgeführt. Dazu wurde auch hier die Methode der *in ovo* Mikroelektroporation herangezogen. Für diese Versuche wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen gewählt. Es wurde zum einen ein dominant negativ wirkendes Konstrukt verwendet, so dass über die Unterdrückung der *Meis2*-Funktion auf die Rolle von *Meis2* geschlossen werden konnte. Bei diesem dominant negativ wirkenden Konstrukt (*Meis2EnR*) handelt es sich um ein Fusionsprotein der gesamten kodierenden Sequenz von *Meis2a* an die Repressordomäne des *engrailed* Proteins aus *D. melanogaster* (Dibner et al., 2001; Inbal et al., 2001; Heine et al., 2008). Das Fusionsprotein kann nach Überexpression an dieselben regulatorischen DNA-Zielsequenzen binden wie auch das endogene *Meis2*. Anstatt die Transkription des Zielgens zu induzieren, werden jedoch über die EnR-Repressordomäne Ko-Repressoren rekrutiert, und es kommt zu einer aktiven Unterdrückung der Expression von *Meis2*-Zielgenen. In einem zweiten Ansatz wurde die gesamte kodierende Sequenz von *Meis2a*, fusioniert an ein dreifaches HA-Epitop (Hämagglutinin aus dem Influenzavirus), im Hühnchenembryo fehlexprimiert. So konnte hier die Funktion von *Meis2* über eine Funktionssteigerung untersucht werden. Die Funktion von *Meis2* wurde in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und auf unterschiedliche Aspekte der Tektumentwicklung hin beleuchtet. Daher wurden die Embryos nach der Manipulation im Stadium HH 9 – 11 für unterschiedliche Zeiten bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos oder an Vibratomschnitten und mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Embryos histologisch oder auf eine Veränderung der Genexpression hin untersucht. Standardmäßig wurde auch hier zusammen mit dem entsprechenden Expressionskonstrukt ein *GFP*-Konstrukt ko-elektroporiert, um zu gewährleisten, dass die Embryos, welche für die Untersuchungen eingesetzt wurden, das gewünschte Plasmid an der richtigen Position enthielten. Um eventuelle unspezifische Effekte der Elektroporationstechnik oder des EnR-Fusionsproteins auszuschließen, wurden als Kontrollexperimente Embryos entweder nur mit *GFP*, oder mit einem anderen nicht relevanten

Homeodomänen-Transkriptionsfaktor, fusioniert an die *engrailed* Repressordomäne (*Sohl/Enr*), elektroporiert.

3.3.1 Meis2 ist an der Ausbildung früher tektaler Strukturen beteiligt

Die ersten ausdifferenzierten Neurone im Gehirn eines Vertebraten formen als ein erstes Axongerüst eine Reihe von longitudinalen und transversalen Axonbündeln in einer stereotypischen Anordnung. Dieses Gerüst wird als Basis des komplexen Nervennetzwerkes des Vertebratengehirns betrachtet. Eine frühe, prominente und in allen Vertebraten vorhandene Struktur ist der mediale longitudinale Faszikel (MLF; Ahsan et al., 2007). Die Axonbündelung hat ihren Ursprung an der Mittelhirn-Vorderhirn Grenze und verläuft entlang des Mittelhirns in das Hinterhirn. Beim MLF handelt es sich um Neurone der vestibulären Kerne, die zu Motoneuronen aufsteigen, welche die äußeren Augenmuskeln innervieren, und zu Segmenten des Rückenmarks absteigen, welche die Nackenmuskeln innervieren. Sie sind somit an der sensomotorischen Integration im adulten Tier beteiligt. Ein weiterer Axonschaft, der laterale longitudinale Faszikel (LLF), wird von Axonen gebildet, deren neuronale Zellkörper im mesenzephalischen trigeminalen Nukleus (MTN) lokalisiert sind. Der LLF und der MLF sind im Hühnchen bereits ab dem Stadium HH 14 zu erkennen (Ahsan et al., 2007). Somit sind diese Strukturen frühe Merkmale des Mittelhirns.

Um einen möglichen Einfluss von Meis2 auf die Entwicklung dieser Strukturen zu untersuchen, wurde *Meis2EnR* im Mittelhirn von HH 11 Hühnchenembryos überexprimiert. Die Axone wurden 24 h nach Elektroporation über die Immunfärbung von Neurofilamenten an flach-präparierten ganzen Mittelhirnen sichtbar gemacht. In wildtypischen Mittelhirnen waren deutlich die beiden longitudinal verlaufenden Axonfaszikel, der LLF und der MLF auf beiden Seiten des flach präparierten Mittelhirns zu erkennen (Abb. 11A, A'). Nach *Meis2EnR*-Überexpression hingegen war in den elektroporierten Bereichen eine massive Störung der Axonfaszikulierung zu beobachten (Abb. 11B, D – E', n = 2). Bei Betrachtung des gesamten Mittelhirns fiel auf, dass der LLF auf der rechten Hälfte des Mittelhirns nahezu nicht mehr vorhanden war (Abb. 11B). In den vergrößerten Ausschnitten sind *Meis2EnR*-transfizierte Bereiche anhand einer Überlappung mit der grünen Fluoreszenz des ko-elektroporierten *GFPs* gezeigt (Abb. 11C', D', E'). Wie in Abbildung 11C und C' zu sehen, verlief der LLF im linken Mittelhirn bis hin zum elektroporierten Gewebe normal gebündelt (vergleiche Abb. 11A', 11C'). Im angrenzenden transfizierten

Gewebe waren jedoch keine Axonfaszikel mehr zu erkennen, sondern nur noch vereinzelte Axone vorzufinden (Abb. 11C, C'). In den zum transfizierten Gewebe angrenzenden Bereichen kam es sogar stellenweise zur Ausbildung von strudel- oder netzartigen Strukturen (Abb. 11C). Die Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn scheint also dazu geführt zu haben, dass die Axone des LLF und auch des MLF nicht mehr in der Lage sind, sich adäquat zu bündeln.

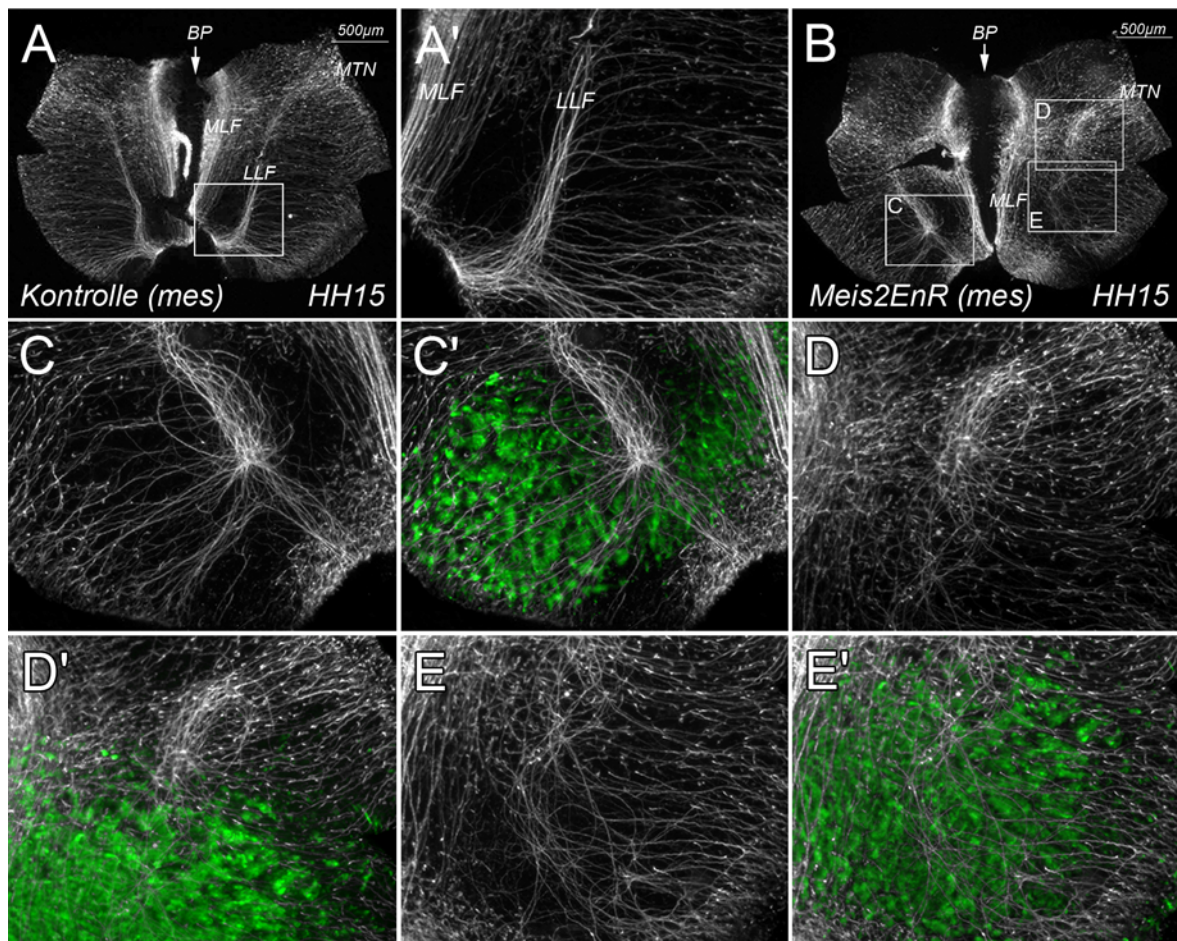


Abbildung 11: Dominant negativ wirkendes *Meis2EnR* stört die Axonfaszikulierung des MLF und LLF im HH 15 Mittelhirn. Immunfluoreszenzfärbung von Neurofilamenten auf Flachpräparaten des Mittelhirns eines wildtypischen Embryos (A, A') oder 24 h nach Überexpression von *Meis2EnR* (B – E'). (C – E') sind vergrößerte Ausschnitte der in B gekennzeichneten Bereiche. (C', D', E') zeigen zusätzlich die GFP-Fluoreszenz zum Nachweis der transfizierten Bereiche. Nach Überexpression von *Meis2EnR* zeigten sich, im Gegensatz zu wildtypischen Mittelhirnen, massive Störungen in der Faszikulierung der Axone des LLFs. MLF: Medialer longitudinaler Faszikel; LLF: Lateraler longitudinaler Faszikel; MTN: Mesencephalischer trigeminaler Nukleus; BP: Bodenplatte. Maßstab: A, B: 500 μ m.

Zusätzlich schienen die Axone, wie in Abbildung 11D zu erkennen ist, keine normale Orientierung zu haben. Vergleicht man Abbildung 11D, E mit Abbildung 11A', so ist zu

sehen, dass Axone, die normalerweise von medial nach lateral parallel zueinander in Richtung des LLF verlaufen, um sich dort zu bündeln, nach *Meis2EnR* Überexpression ungerichtet und nicht parallel zu einander verliefen. Sie schienen keine bestimmte Ordnung zu haben und wuchsen orientierungslos. Die Unterdrückung der *Meis2*-Funktion resultierte also in einer Wachstumsstörung der ersten Axone im Mittelhirn.

3.3.2 *Meis2* ist an der Ausbildung der tektumspezifischen Laminierung beteiligt

Um eine eventuelle Funktion von *Meis2* auch bei der Entwicklung späterer tektaler Strukturen zu untersuchen, wurden Embryos nach Überexpression des *Meis2EnR*-Konstruktes zu späteren Entwicklungsstadien analysiert. Zunächst konnten bereits am gesamten Gehirn phänotypische Veränderungen des Tektums auf der experimentellen, rechten Seite nach Überexpression von *Meis2EnR* im Vergleich zur linken Kontrollseite und im Vergleich zum Kontrollexperiment nach Überexpression von *GFP* alleine beobachtet werden (Abb. 12A, B). Die *Meis2EnR*-transfizierten Tekta waren kleiner und hatten eine unebene, wellenartige Struktur (Abb. 12B; n = 5/7).

Die mit *Meis2EnR* transfizierten Tekta 8 Tage alter Hühnchenembryos wurden anschließend durch eine Färbung der Zellkerne mit DAPI auf transversalen Gefrierschnitten näher analysiert. Diese Analyse machte deutlich, dass die Transfektion von *Meis2EnR* zu einer massiven Veränderung der tektumspezifischen zellulären Organisation geführt hat (Abb. 12B', B''). Die Zellen des optischen Tektums sind in mehreren Laminae angeordnet, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen Zelldichten mittels einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht werden können. Dies war in der *GFP*-transfizierten Kontrolle gut zu erkennen (Abb. 12A', A''). Nach Überexpression von *Meis2EnR* war die Laminierung des optischen Tektums zwar in vielen Bereichen ansatzweise noch zu erkennen, in den meisten Bereichen war sie jedoch massiv gestört und teilweise überhaupt nicht mehr vorhanden. Die noch zu erkennenden Laminae unterschieden sich zudem phänotypisch stark von der tektalen Schichtung im Kontroll-Tektum. Zum einen waren das Neuroepithel und eine weitere, oben befindliche Schicht nicht durchgängig sondern unterbrochen. Zum anderen waren das Neuroepithel und die direkt darauf folgende Schicht dicker und bildeten Wucherungen die weitgehend das gesamte Lumen des optischen Tektums einnahmen (Abb. 12B').

Wie Immunfluoreszenzfärbungen im *Meis2EnR*-transfizierten Tektum zeigten, war in den Bereichen der fehlenden Laminierung auch keine Expression der tektalen Proteine Pax7

und Meis2 mehr nachzuweisen (Abb. 12D). Im *GFP*-elektroporierten Tektum war hingegen eine große Anzahl sowohl Pax7- als auch Meis2-immunreaktiver Zellen vorhanden (Abb. 12C). Die Expression der beiden Proteine war zudem Zellen in definierten Laminar des optischen Tektums zuzuordnen. Demzufolge enthalten die Bereiche fehlender Laminierung nach *Meis2EnR*-Transfektion keine tektumspezifische Expression und somit keine tektum-charakteristischen Zellen.

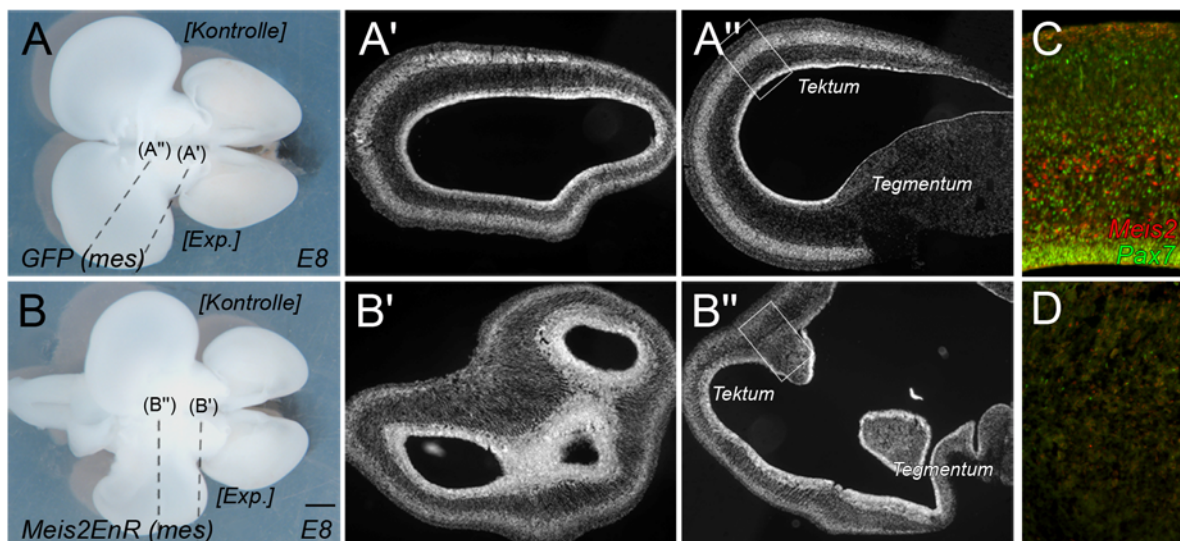


Abbildung 12: Überexpression von *Meis2EnR* stört die Entwicklung der tektumspezifischen Laminierung. (A, B) Vom umgebenden mesenchymalen Gewebe isolierte Gehirne 6,5 Tage nach Überexpression von *GFP* als Kontrolle (A) oder *Meis2EnR* (B). Das rechte mit *Meis2EnR* elektroporierte Tektum erscheint kleiner und hat eine unebene Struktur. (A – B'') Anfärbung der Zellkerne durch DAPI auf transversalen Gefrierschnitten im *GFP*-elektroporierten (A', A'') und im mit *Meis2EnR* elektroporierten optischen Tektum (B', B''). Durch die gestrichelten Linien sind die jeweiligen Schnittebenen der Gefrierschnitte dargestellt. (C, D) Immunfluoreszenzfärbung von Meis2 und Pax7 im mit *GFP* elektroporierten (C) und im mit *Meis2EnR* elektroporierten optischen Tektum (D). Die dargestellten Bereiche sind in A'' bzw. in B'' gekennzeichnet. Während das mit *GFP* elektroporierte optische Tektum Meis2 und Pax7 positive Zellen aufwies, konnten beide Proteine in Bereichen der gestörten Laminierung nach *Meis2EnR*-Überexpression nicht nachgewiesen werden. Exp. Experiment, mes: Mesenzephalon. Maßstab: 1 mm.

Die Überexpression des dominant negativ wirkenden *Meis2EnR* führte also zu einem Verlust bzw. zu einer starken Veränderung tektumspezifischer Strukturen. Die Unterdrückung von Meis2-Funktion störte die Entwicklung sowohl früher als auch später tektaler Strukturen. Es kam zu einer Störung in der Faszikulierung von Axonen, einer gestörten Entwicklung der tektumspezifischen Laminierung und zu einem Verlust tektumspezifischer Proteinexpression. Diese Ergebnisse weisen auf essentielle Funktionen von Meis2 bei der Entwicklung des optischen Tektums hin.

3.3.3 Meis2 reguliert die Expression des tektalen Markergens *ephrinB1*

Meis2 ist ein Transkriptionsfaktor. Daher übt es seine Funktion aus, indem es an bestimmte Zielsequenzen in regulatorischen Elementen von Genen bindet und dort, in Zusammenarbeit mit weiteren regulatorischen Faktoren, die Expression dieser Gene reguliert. In den vorangegangenen Versuchen wurde eine Störung in der Entwicklung tektumspezifischer Strukturen durch die Verwendung des *Meis2EnR*-Konstruktes beobachtet. Diese Entwicklungsstörungen sind vermutlich auf die Unterdrückung Meis2 regulierter Zielgene zurückzuführen. Um die Rolle von Meis2 bei der Entwicklung des optischen Tektums besser zu verstehen, ist es unerlässlich zumindest einige der tektalen Gene zu identifizieren, die durch Meis2 im Mittelhirn reguliert werden.

Der Sehsinn wird im optischen Tektum in einer retinotopen Karte repräsentiert. Für die Entstehung dieser retinotektalen Projektion wachsen die Axone retinaler Ganglienzellen im Laufe der Embryonalentwicklung ins optische Tektum ein und müssen dabei, abhängig von ihrem Ursprungsort in der Retina, an ganz bestimmte Zielzonen gelangen. Das Wachstum der Axone wird hierbei von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die sowohl Zellen der Retina als auch tektalen Zellen eine Positionsidentität verleihen. Dies ist für die korrekte Entwicklung der retinotopen Karte erforderlich. Eine Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, die Eph-Rezeptoren und ihre Liganden, die Ephrine, spielen hierbei eine wichtige Rolle. Dabei ist das spezifische Expressionsmuster dieser Moleküle in der Retina und im optischen Tektum in Form von Gradienten entscheidend. Es wird angenommen, dass für eine korrekte retinotop Kartierung entlang der DV-Achse des optischen Tektums der Rezeptorligand *ephrinB1* erforderlich ist (Hindges et al., 2002; McLaughlin et al., 2003). *EphrinB1* wird jedoch nicht nur während der Bildung der retinotopen Karte, sondern bereits zu früheren Zeitpunkten, spätestens ab HH 14, stark im Mittelhirn exprimiert. *EphrinB1* kann daher als tektales Markergen betrachtet werden (Braisted et al., 1997).

Wie ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit zeigen konnte, wird die Expression von *ephrinB1* 24 h nach Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn, nicht aber nach Überexpression des Kontroll-EnR Konstruktes *SoHo1EnR*, unterdrückt (Agoston, Diplomarbeit 2005). Dieses Ergebnis konnte auch in ergänzenden Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb.13; Gesamt n = 22/28). Es wurden nach Überexpression

von *Meis2EnR* ins Mittelhirn zusätzlich Doppel-*in situ* Hybridisierungen mit einer zweiten Sonde für *GFP* durchgeführt, die das Vorhandensein der elektroporierten Konstrukte im Mittelhirn bestätigten. Die Expression von *ephrinB1* war im elektroporierten Bereich fleckenartig unterdrückt (Abb. 13A – B; n = 6). Zusätzlich konnte die Unterdrückung von *ephrinB1*-Transkripten nach Überexpression von *Meis2EnR* auch mittels *in situ* Hybridisierung auf Vibratomschnitten mit dem Nachweis von *ephrinB1*- und *GFP*-Expression auf alternierenden Schnitten deutlich gemacht werden (Abb. 13D, E; n = 3).

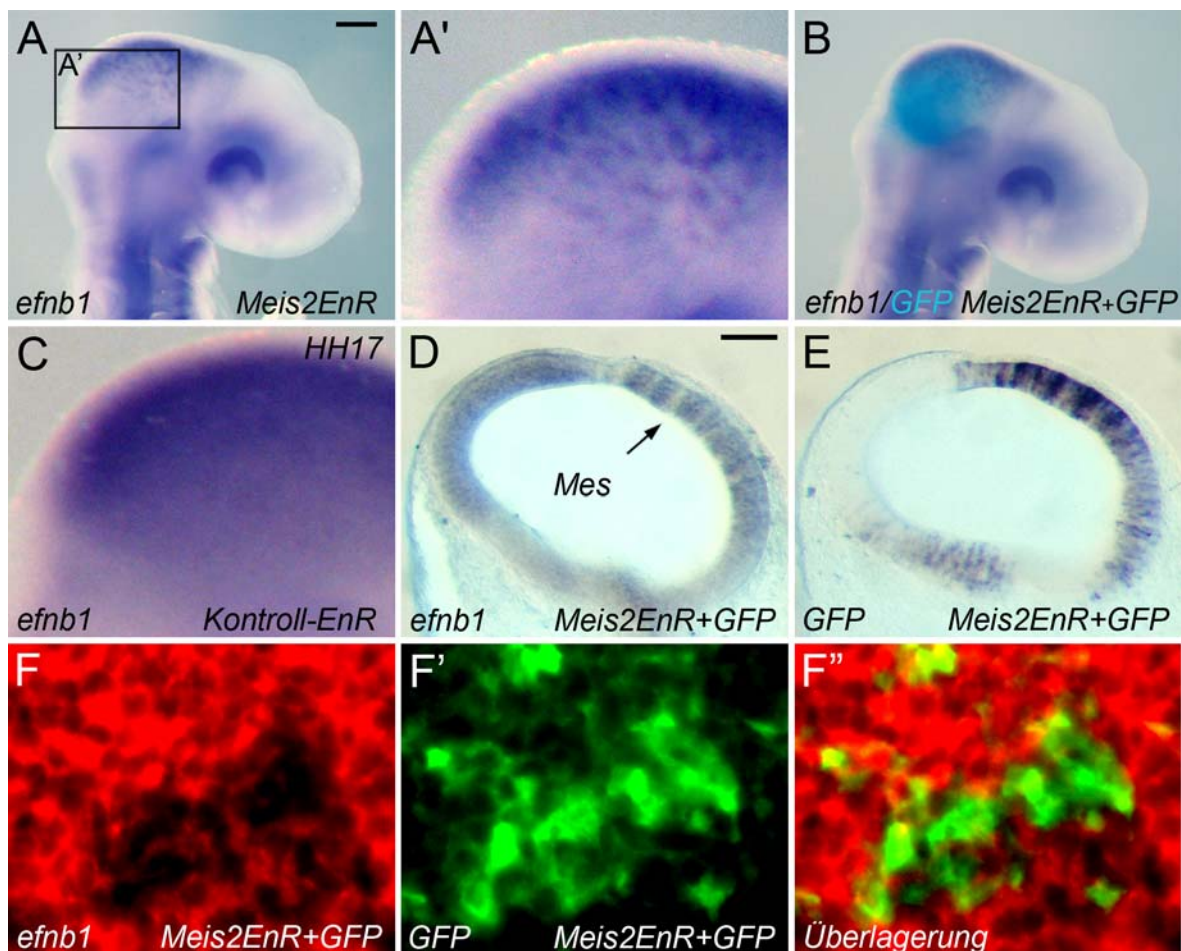


Abbildung 13: Überexpression von *Meis2EnR* führt zur Unterdrückung des tektalen Gens *ephrinB1*. (A, A') *In situ* Hybridisierung am ganzen Embryo mit einer *ephrinB1*-spezifischen Sonde 24 h nach Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn. (A') Vergrößerter Ausschnitt des in A gekennzeichneten Bereiches. (B) Zweitfärbung mit einer *GFP*-Sonde auf dem Embryo in A zum Nachweis des transfizierten Bereiches. (C) Expression von *ephrinB1* nach Überexpression des Kontroll-EnR Konstruktes. (D, E) *In situ* Hybridisierungen auf benachbarten koronalen Vibratomschnitten durch das Mittelhirn 24 h nach Überexpression von *Meis2EnR* zum Nachweis von *ephrinB1* (D) und *GFP* (E). Der Pfeil in D deutet auf den Bereich der *ephrinB1*-Unterdrückung. (F – F'') Nachweis der *ephrinB1*-Expression mittels des rotfluoreszierenden Farbstoffes „fast red“ (F) und GFP-Fluoreszenz zum Nachweis des elektroporierten Bereichs (F') 24 h nach Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn. (F'') Überlagerung der rot- und der grünfluoreszierenden Bereiche weist auf eine zellautonome Unterdrückung der *ephrinB1*-Expression durch *Meis2EnR* hin. Maßstab: A, B: 200 µm; D, E: 200 µm.

Die Unterdrückung von *ephrinB1* in *Meis2EnR*-elektroporierten Bereichen war noch deutlicher an vergrößerten Ausschnitten des Mittelhirns nach Färbung der *ephrinB1*-Transkripte mittels des rotfluoreszierenden Farbstoffes „*fast red*“ zu sehen. Die Überlagerung der grünen mit der roten Fluoreszenz zeigte, dass GFP-positive, also transfizierte Bereiche keine *ephrinB1*-Expression aufwiesen (Abb. 13F – F’; n = 2). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Unterdrückung der *ephrinB1*-Expression durch *Meis2EnR* zellautonom erfolgt.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnten bislang drei konservierte Domänen in Meis-Proteinen identifiziert werden: Die so genannte TALE-Homeodomäne, eine DNA-Bindedomäne, die N-terminale MEINOX-Domäne, welche als Protein-Protein-Interaktionsdomäne beschrieben wurde, und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne, die bei Meis1 identifiziert werden konnte (Burglin, 1997; Huang et al., 2005). Es ist bisher allerdings noch unklar, welche dieser drei Domänen für die volle Funktion von Meis2 benötigt werden. Um einen ersten Einblick in die Funktionsweise von Meis2 im Bezug auf die Regulation von *ephrinB1* im Mittelhirn zu erlangen, wurden zwei verschiedene deletierte Formen des Meis2-Proteins, die ebenfalls an die EnR-Repressordomäne fusioniert sind, im Mittelhirn überexprimiert. Dies war zum einen ein Konstrukt, welches keine Homeodomäne aber die MEINOX-Domäne besitzt (*Meis2ΔHDEnR*) und zum anderen wurde ein Konstrukt ohne die N-terminale MEINOX-Domäne aber mit der TALE-Homeodomäne verwendet (*Meis2ΔMDEnR*).

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, führte die Überexpression von *Meis2ΔHDEnR* im Mittelhirn 24 h nach Elektroporation nicht zu einer Veränderung der *ephrinB1*-Expression im Mittelhirn (Abb. 14A; n = 7). Mit einer anschließenden Zweitfärbung von GFP-Transkripten konnte der elektroporierte Bereich sichtbar gemacht werden (Abb. 14A’). Die Fehlexpression von *Meis2ΔMDEnR* resultierte nach 24 h ebenfalls nicht in einer starken Veränderung der *ephrinB1*-Expression. Hier waren jedoch vereinzelt Bereiche mit kleinen, fleckenartigen Unterbrechungen zu erkennen, die auf eine schwache Unterdrückung der *ephrinB1*-Expression hindeuten (Abb. 14B; n = 3/5). Die Unterdrückung war jedoch nicht annähernd mit der Intensität der Unterdrückung von *ephrinB1* nach Überexpression des Volllängen-*Meis2EnR* zu vergleichen (Abb. 13). Auch hier konnte mittels einer Zweitfärbung von GFP das Vorhandensein des Konstruktes im Mittelhirn bestätigt werden (Abb. 14B’).

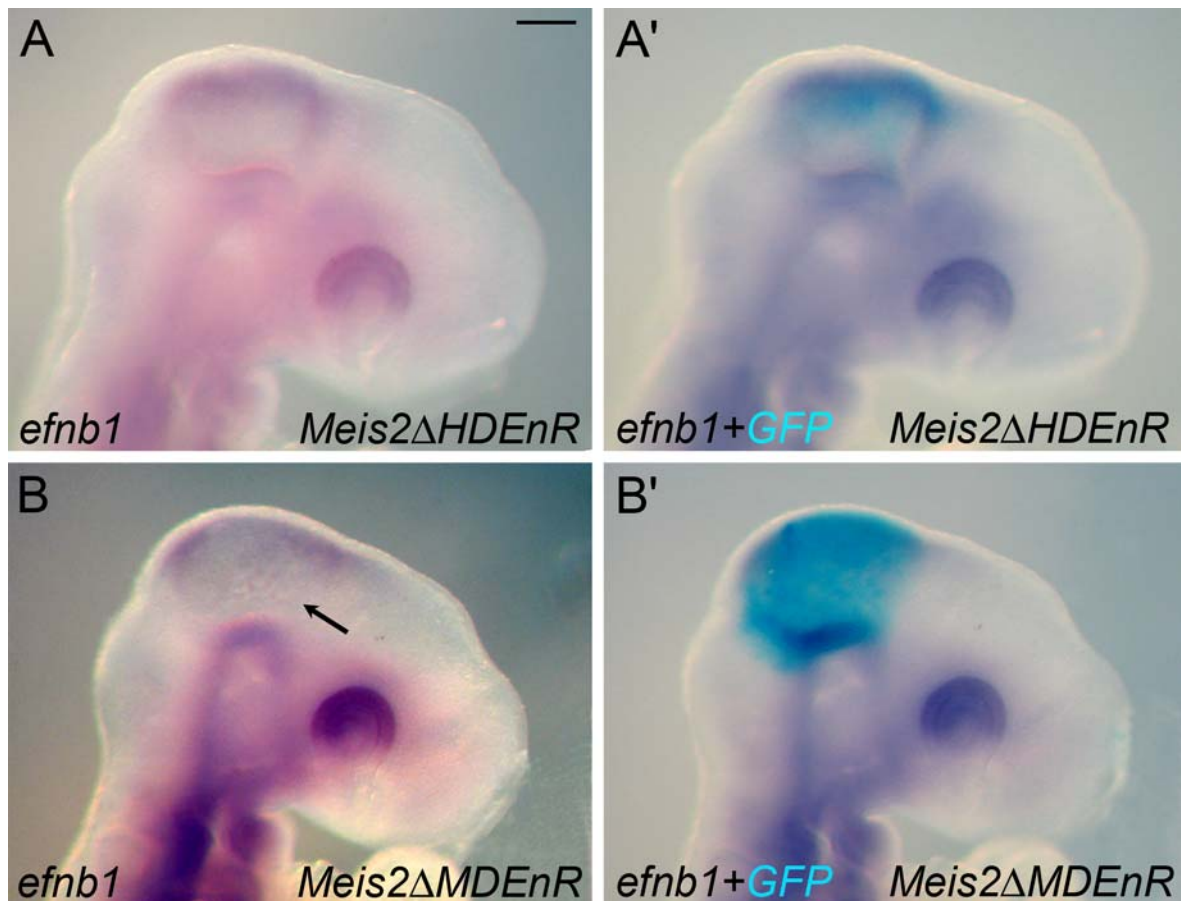


Abbildung 14: Der Einfluss der Homeo- und der MEINOX-Domäne von Meis2 auf die Regulation von *ephrinB1* im Mittelhirn. (A – B') *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos zum Nachweis von *ephrinB1* Transkripten 24 h nach Überexpression von *Meis2ΔHDEnR* (A, A') und *Meis2ΔMDEnR* (B, B') im Mittelhirn. (A', B') Zweitfärbung der Embryos in A bzw. B mit einer *GFP*-Sonde zum Nachweis der elektroporierten Bereiche. Der Pfeil in B deutet auf den Bereich einer schwachen Unterdrückung von *ephrinB1*. Das Fehlen einer der beiden Domänen von Meis2 führte zum Funktionsverlust von Meis2, da es in beiden Fällen nicht zu einer massiven Unterdrückung der *ephrinB1*-Expression kam. Die Überexpression von *Meis2ΔHDEnR* veränderte die *ephrinB1*-Expression nicht während das *Meis2ΔMDEnR* in einer leichten Unterdrückung von *ephrinB1* resultierte. Maßstab A – B': 200 µm.

Diese Versuche deuteten darauf hin, dass Meis2 für die Ausführung seiner Funktion bezüglich der Regulation von *ephrinB1* beide Domänen, die Homeodomäne und die MEINOX-Domäne, benötigt. Es scheint jedoch einen Unterschied in der Bedeutung des Verlustes der beiden Domänen zu geben. Während das Fehlen der Homeodomäne in einem kompletten Funktionsverlust resultierte, schien der Verlust der MEINOX-Domäne noch einen geringen Teil der Funktion zu ermöglichen.

Die Expression von *ephrinB1* wurde im Mittelhirn von dem dominant negativ wirkenden *Meis2EnR* unterdrückt, was ein Hinweis darauf ist, dass *ephrinB1* ein Zielgen von Meis2 ist und Meis2 im Normalfall die Expression von *ephrinB1* im Mittelhirn induziert. Dieser Befund konnte mit Hilfe weiterer Überexpressionsstudien untermauert werden. Dazu wurde *Meis2HA* im Dienzephalon fehlexprimiert, einem Bereich in dem *Meis2* und auch *ephrinB1* normalerweise nicht exprimiert werden. Nach *in situ* Hybridisierungen mit einer spezifischen Sonde gegen *ephrinB1*-Transkripte zeigten sich vereinzelte, punktförmige Bereiche der *ephrinB1*-Expression im Dienzephalon nach Fehlexpression von *Meis2HA*, nicht aber nach Elektroporation von *GFP* ins Dienzephalon oder im Wildtyp (Abb. 15A – A^a, C, *Meis2HA*: n = 10/12; GFP nicht gezeigt; n = 0/14; Abb. 15B).

Ein anschließender, Antikörper-vermittelter Nachweis des GFP-Proteins bestätigte, dass die Konstrukte in das Dienzephalon transfiziert wurden. Die ektopische *ephrinB1*-Expression korrelierte mit den transfizierten Bereichen im Dienzephalon (Abb. 15A', A'^a). Um diesen Befund zu untermauern wurden auch hier *in situ* Hybridisierungen auf koronalen Vibratomschnitten durchgeführt, die eine Induktion von *ephrinB1* in Bereichen des mit *Meis2HA*-elektroporierten Gewebes im dorsalen Dienzephalon bestätigten (Abb. 15D – E; n = 4).

Somit induziert die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon eine ektopische Expression von *ephrinB1*.

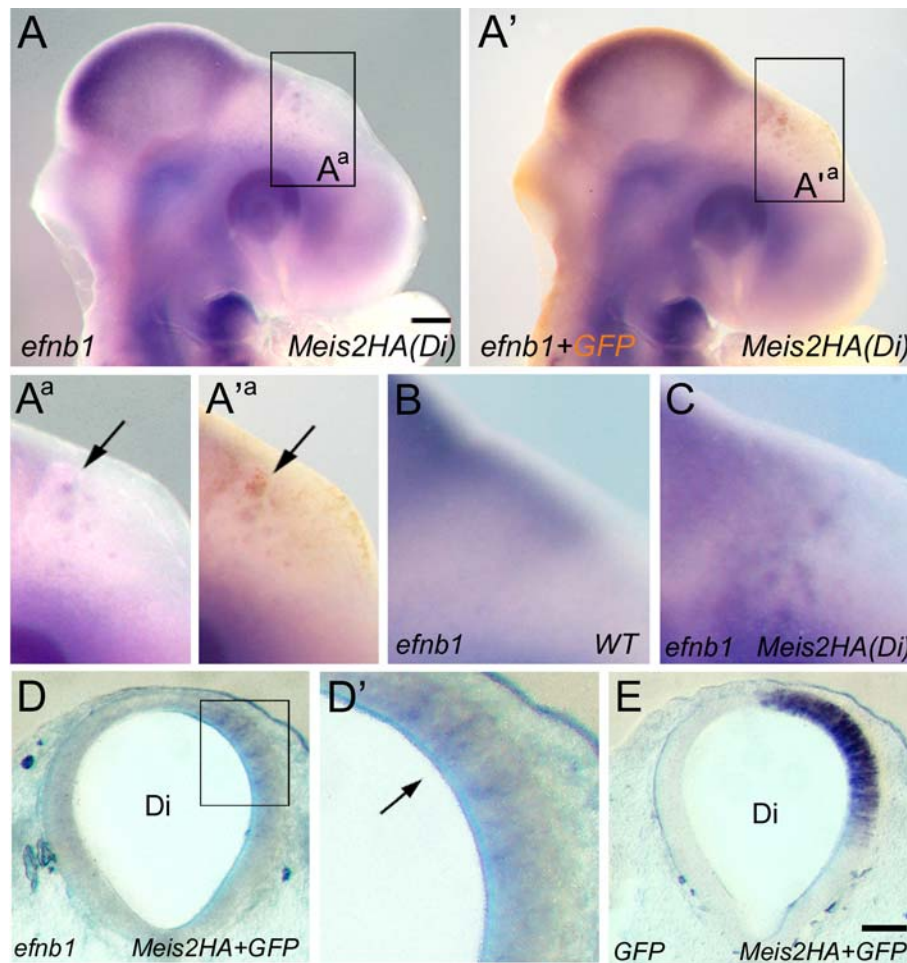


Abbildung 15: Fehlexpression von *Meis2* im Diencephalon induziert *ephrinB1*-Expression. (A – A^a, C) *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos mit einer *ephrinB1*-spezifischen Sonde 24 h nach Überexpression von *Meis2HA* im Diencephalon. (A') Zweitfärbung mittels eines GFP-Antikörpers am in A gezeigten Embryo zum Nachweis des elektroporierten Bereiches. (A^a, A'^a) Vergrößerte Ausschnitte der gekennzeichneten Bereiche in A bzw. A'. (B) Ausschnitt des Diencephalons eines wildtypischen Embryos nach *in situ* Hybridisierung mit einer *ephrinB1*-Sonde. (C) Ausschnitt zeigt *ephrinB1*-Expression im Diencephalon nach Überexpression von *Meis2HA*. (D – E') *In situ* Hybridisierung auf benachbarten koronalen Vibratonschnitten zum Nachweis von *ephrinB1* (D) und *GFP* (E) 24 h nach Überexpression von *Meis2HA* im Diencephalon. (D') Vergrößerter Ausschnitt des in D gekennzeichneten Bereiches. Die Pfeile in A^a, A'^a, D' zeigen auf die ektopische *ephrinB1*-Expression im Diencephalon. Maßstab: A, A': 200 µm; D, E: 200 µm.

Um zu überprüfen, ob *Meis2* *ephrinB1*-Expression auch in einem anderen Bereich des Neuralrohrs induzieren kann, wurde *Meis2HA* im Metenzephalon fehlexprimiert. Anschließend *in situ* Hybridisierungen mit *ephrinB1*- und *GFP*-Sonden bestätigten zwar die Anwesenheit der Konstrukte in dem entsprechenden Gewebe, es waren jedoch keine ektopischen *ephrinB1*-Transkripte im Metenzephalon nachzuweisen (Abb. 16B', B'^a, Abb. 16B, B^a). Der transfizierte Bereich glich der wildtypischen Kontrolle (vergleiche Abb. 16A, B).

Somit führte die Fehlexpression von *Meis2HA* im Metenzephalon, im Gegensatz zum Diencephalon, 24 h nach Elektroporation nicht zu einer Induktion von *ephrinB1* (n = 4).

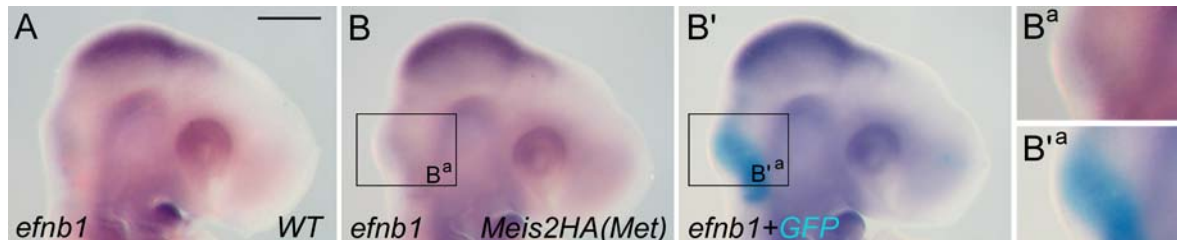


Abbildung 16: Fehlexpression von *Meis2* im Metenzephalon induziert keine *ephrinB1*-Expression. (A – B^a) *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos zur Detektierung von *ephrinB1*-Transkripten im wildtypischen Embryo (A) und nach Überexpression von *Meis2HA* im Metenzephalon (B). (B') Embryo aus B nach Zweitfärbung mit einer *GFP*-Sonde. (B^a, B'^a) Vergrößerte Ausschnitte der gekennzeichneten Bereiche in B bzw. B'. WT: Wildtyp, Met: Metenzephalon. Maßstab A – B': 500 µm.

Diese Versuche zeigten, dass die Expression des tektalen Markergens *ephrinB1* im Mittelhirn einer Regulation durch *Meis2* unterliegt. Dieser Befund basiert auf zwei experimentellen Ansätzen: Zum einen wurde die Expression von *ephrinB1* im Mittelhirn nach Überexpression des dominant negativen *Meis2EnR* unterdrückt, zum anderen führte die Fehlexpression von *Meis2HA* im Diencephalon zu einer Induktion von *ephrinB1*. Bemerkenswerterweise werden normalerweise weder *ephrinB1* noch *Meis2* in diesem Gewebe exprimiert. *Meis2* ist also in der Lage, die Transkription eines tektalen Gens in einem Gewebe zu induzieren, dessen eigentliches Schicksal die Bildung einer anderen Hirnregion ist. Im Gegensatz dazu wurde *ephrinB1* im Metenzephalon nicht induziert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Möglichkeit einer *ephrinB1*-Induktion durch *Meis2* auf bestimmte Regionen des Neuralrohrs beschränkt ist.

3.3.4 *Meis2* reguliert die Expression von *Dbx1* im Mittelhirn

Dbx1 (*developing brain homeobox 1*), ist ein Homeodomänen-Transkriptionsfaktor und wird im Neuralrohr des Embryos, neben anderen Bereichen, auch im Mittelhirn exprimiert (Lu et al., 1992; Shoji et al., 1996). Im ventralen Rückenmark kennzeichnet die *Dbx1*-Expression eine Gruppe von neuronalen Vorläuferzellen in der Maus und im Hühnchen. Fehlexpressionsstudien zeigten, dass *Dbx1* im Krallenfrosch neuronale Differenzierung unterdrücken kann (Gershon et al., 2000; Pierani et al., 2001). Die Überexpression von

hlx1, des zu Dbx1 homologen Proteins im Zebrafisch, resultierte in einem „fused-brain“ Phänotyp, einer Verschmelzung der Vesikel. Der Funktionsverlust von hlx1 beeinträchtigte hingegen die Entwicklung der frühen Axonbündel im Vorderhirn (Hjorth et al., 2002).

Auf der Suche nach weiteren Zielgenen von Meis2 im Mittelhirn wurde das dominant negative *Meis2EnR* erneut im Mittelhirn fehlexprimiert. Anschließend wurde mit *in situ* Hybridisierungen zum Nachweis von *Dbx1*-Transkripten die Möglichkeit überprüft, dass Meis2 im Mittelhirn die Expression von *Dbx1* reguliert. Doppel-*in situ* Hybridisierungen, die einen zusätzlichen Nachweis von *GFP* ermöglichen, zeigten einen Verlust von *Dbx1*-Transkripten in den elektroporierten Bereichen 24 h nach Transfektion von *Meis2EnR* (Abb. 17A, A', B, n = 8/9). Dies konnte nicht nach Elektroporation des *Kontroll-EnR* Konstruktes beobachtet werden (Abb. 17D, E; n = 4). Die wildtypische Expression von *Dbx1* im Hühnchen bei HH 15 ist in Abbildung 17C dargestellt. Die Fehlexpression von *Meis2EnR* führte also zu einer Unterdrückung der *Dbx1*-Expression im Mittelhirn. Dies deutet darauf hin, dass *Dbx1* ein weiteres Zielgen von Meis2 im Mittelhirn ist.

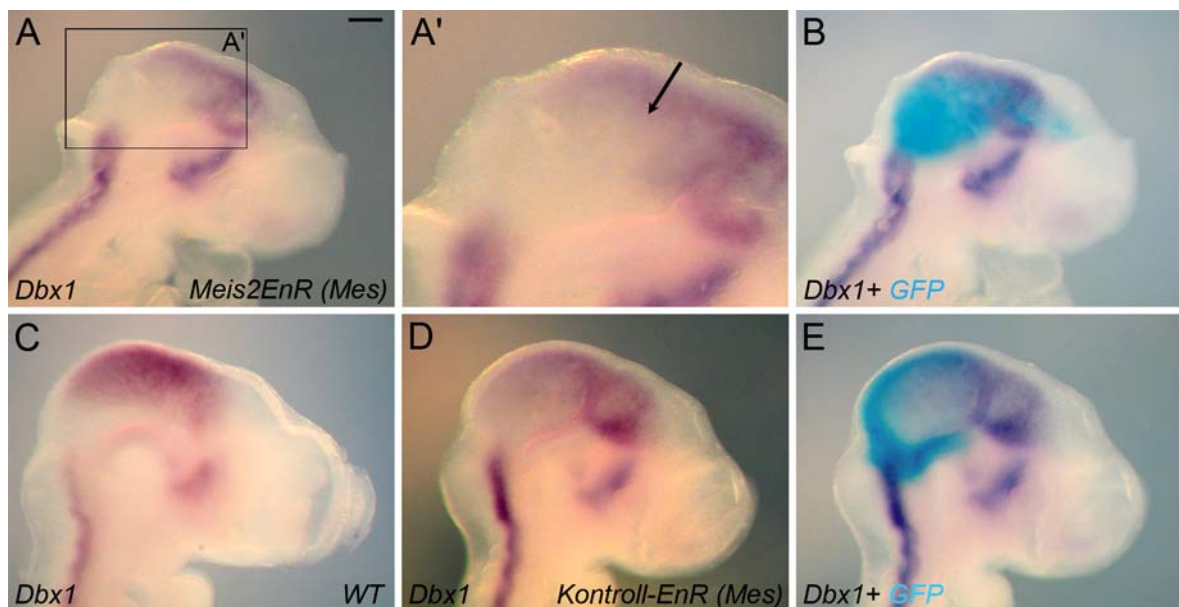


Abbildung 17: Fehlexpression von *Meis2EnR* führt zur Unterdrückung von *Dbx1* im Mittelhirn. (A – E) Expression von *Dbx1* nach Fehlexpression von *Meis2EnR* (A, A', B), im wildtypischen Embryo (C) und nach Fehlexpression des Kontroll-EnR Konstruktes (D, E). (B, E) Doppel-*in situ* Hybridisierung der in A und E gezeigten Embryos mit einer *GFP*-Sonde. Der Pfeil in A' deutet auf den Bereich der *Dbx1*-Unterdrückung. Mes: Mesenzephalon; WT: Wildtyp. Maßstab A, B, C – E: 200 µm.

3.3.5 Meis2 induziert im Dienzephalon ein ektopisches Tektum

Die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon resultierte 24 h nach Elektroporation in einer Induktion des tektalen Markergens *ephrinB1* (Kap. 3.3.4). Dies lässt vermuten, dass Meis2 zumindest einen Teil seiner Funktionen auch im Dienzephalon ausüben kann, obwohl es dort während der Entwicklung des Hühnchens normalerweise nicht exprimiert wird.

Um zu überprüfen, ob die Fehlexpression von *Meis2HA* auch einen Einfluss auf die weitere Entwicklung des Dienzephalons nimmt, wurden Hühnchenembryos nach Elektroporation von *Meis2HA* ins Dienzephalon auch bis zu älteren Entwicklungsstadien inkubiert. Am embryonalen Tag E 7,5, also 6 Tage nach Transfektion von *Meis2HA* ins Dienzephalon, war im Bereich des rechten elektroporierten Dienzephalons ein kugelförmiger Auswuchs des Gewebes zu erkennen (Abb. 18A, A'; n = 5). Dieser war auf der linken, nicht elektroporierten Seite nicht vorhanden (Abb. 18A).

Für eine detailliertere Analyse dieses Gewebes wurden Gefrierschnitte angefertigt, die anschließend mit verschiedenen Markern immunhistochemisch untersucht wurden. Wie diese Experimente zeigten, exprimierten die Zellen der ektopisch gewachsenen Struktur im Dienzephalon Meis2 und Pax7 (Abb. 18C – C''). Beide Proteine werden normalerweise nicht im Dienzephalon, jedoch im optischen Tektum exprimiert. Dies bestätigten auch immunhistochemische Färbungen unter Verwendung der gleichen Marker auf Schnitten der kontralateralen, nicht elektroporierten Kontrollseite, die für beide Proteine negativ waren (Abb. 18B). Darüber hinaus fiel, die durch die Färbungen deutlich gewordene, laminare Anordnung der Zellen des ektopischen Gewebes auf, die der charakteristischen zellulären Anordnung des normalen optischen Tektums ähnelte. Ein Vergleich der ektopischen Struktur mit dem Meis2- und Pax7-gefärbten optischen Tektum des gleichen Hirns, verdeutlichte die histologische Ähnlichkeit der beiden Gewebe (vergleiche Abb. 18C'', D). Da diese Art der Laminierung und Proteinexpression ein Charakteristikum des Tektums ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem ektopisch entstandenen Gewebe im Dienzephalon um ein sich entwickelndes tektales Gewebe handelt. Obwohl die Schichtung der Meis2- und Pax7-positiven Zellen weitgehend der Anordnung des wildtypischen Tektums entsprach, spiegelte sie nicht exakt den Laminierungsgrad des optischen Tektums wider. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das ektopische Tektum in der Entwicklung verzögert ist.

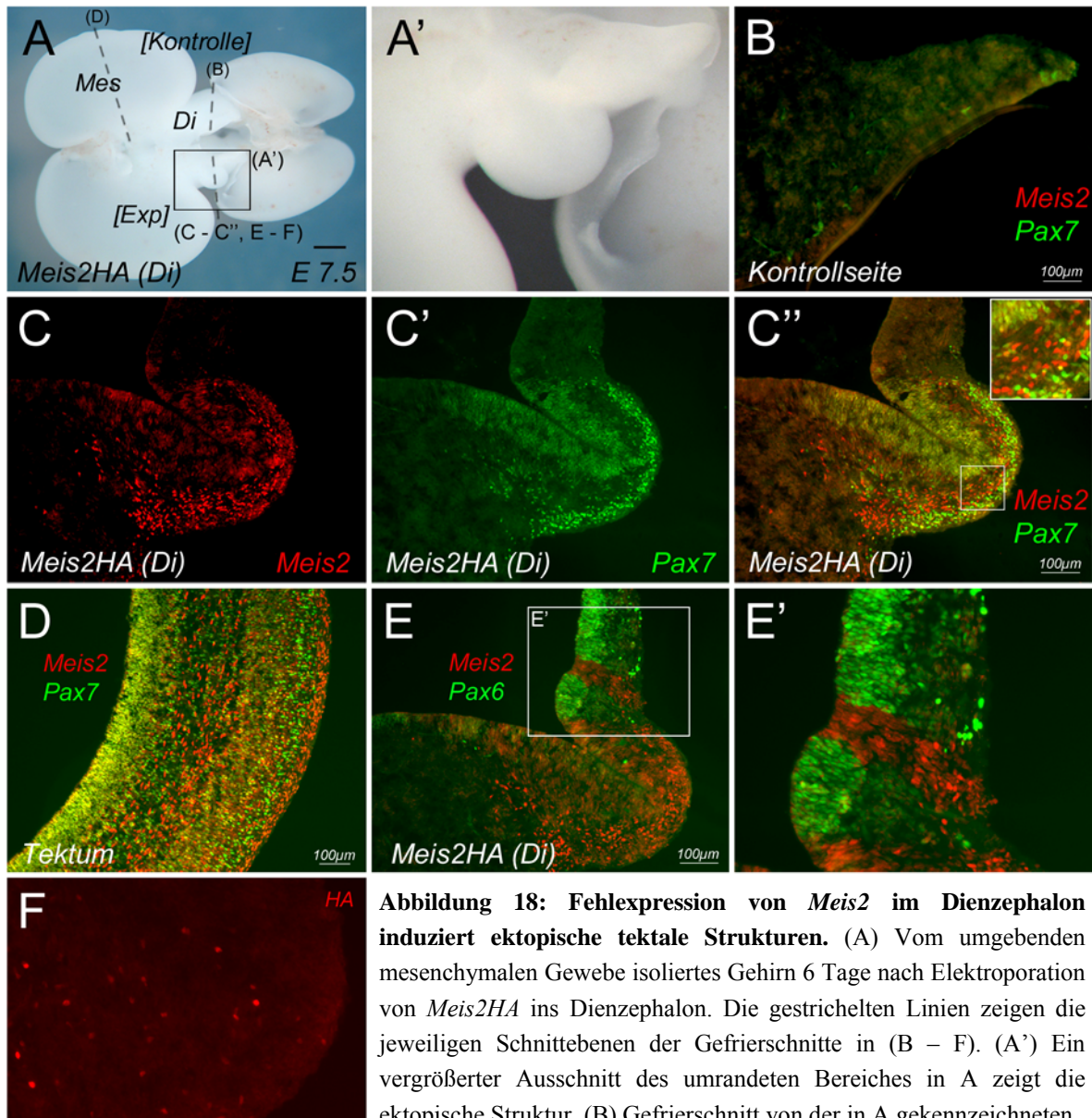


Abbildung 18: Fehlexpression von *Meis2* im Dienzephalon induziert ektopische tektale Strukturen.

(A) Vom umgebenden mesenchymalen Gewebe isoliertes Gehirn 6 Tage nach Elektroporation von *Meis2HA* ins Dienzephalon. Die gestrichelten Linien zeigen die jeweiligen Schnittebenen der Gefrierschnitte in (B – F). (A') Ein vergrößerter Ausschnitt des umrandeten Bereiches in A zeigt die ektopische Struktur. (B) Gefrierschnitt von der in A gekennzeichneten linken, nicht elektroporierten Seite gefärbt mit Antikörpern gegen *Meis2* und *Pax7*. (C – C'') Antikörperfärbung von *Meis2* (C) und *Pax7* (C') auf einem Schnitt durch den in A gekennzeichneten Bereich. (C'') Überlagerung von C und C'. (D) Antikörperfärbung gegen *Meis2* und *Pax7* auf einem in A gekennzeichneten Schnitt durch das optische Tektum. (E) Antikörperfärbung von *Meis2* und *Pax6* auf einem Schnitt im Bereich der ektopischen Struktur. (E') Vergrößerter Ausschnitt vom in E umrandeten Bereich. (F) Antikörperfärbung gegen den HA-Anteil von *Meis2HA* im Bereich der ektopischen Struktur. Exp: experimentelle Seite; Di: Dienzephalon; Mes: Mesenzephalon. Maßstab A: 1 mm; B – E: 100 μm.

Die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon kann also die Entwicklung eines ektopischen Tektums induzieren. Das bedeutet zunächst, dass ein ursprünglich dienze-phalisch prädestiniertes Gewebe durch die Expression von *Meis2HA* einen mesenzepha-lischen Charakter erlangt. Einen Hinweis auf eine Veränderung des dienze-phalischen Schicksals lieferten weitere immunhistochemische Färbungen unter Verwendung eines Antikörpers gegen *Pax6*, einem Transkriptionsfaktor, dessen Expression charakteristisch

für das Dienzephalon ist. Obgleich das ektopische Gewebe direkt im Dienzephalon lokalisiert war, konnte hier keine Pax6-Expression nachgewiesen werden. Das Gewebe war hingegen, wie zuvor schon beobachtet, positiv für Meis2 (Abb. 18E, E'). Pax6-immunreaktive Zellen waren nur im zum ektopischen Tektum angrenzenden Gewebe vorzufinden (Abb. 18E). Darüber hinaus fand sich im Bereich der Pax6-positiven, dienze-phalischen Domäne, eine weitere Domäne von Meis2-positiven Zellen. Die Zellen, die Meis2 exprimierten wiesen jedoch kein Pax6 auf (Abb. 18E'). Die Pax6-Expression fehlte also komplett im Bereich des ektopischen Gewebes. Neben der Expression tektaler Marker, ist dies ein klarer Hinweis dafür, dass es sich hierbei nicht um dienze-phalisches Gewebe handelt. Außerdem scheint Pax6 in diesem Fall nicht in Meis2-positiven Zellen exprimiert zu werden. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass Meis2 entweder direkt oder indirekt zu einer Unterdrückung des dienze-phalischen Schicksals geführt hat und so mesenze-phalischen Charakter fördern konnte.

Wie oben bereits erwähnt, waren im ektopischen Tektum viele, meist in bestimmten Laminae angeordnete Zellen, immunreaktiv für Meis2. Dies warf die Frage auf, ob es sich hierbei um das ektopisch eingebrachte *Meis2HA* oder endogen exprimiertes Meis2 handelte. Um dies zu überprüfen, wurden an Schnitten des ektopischen Tektums immun-histochemische Färbungen zum Nachweis des HA-Anteils von Meis2HA durchgeführt. Hier zeigten sich nur wenige vereinzelte HA-positive Zellen im Gewebe (Abb. 18F). Im Großteil der in Abbildung 18C gezeigten Meis2-positiven Zellen muss Meis2 demnach endogen exprimiert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Meis2HA direkt oder indirekt seine eigene Expression induziert.

In Abbildung 19 ist ein ektopisches Tektum 11,5 Tage nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon dargestellt (Abb. 19A – B; n = 5). Immunhistochemische Färbungen von Meis2 und Pax7 auf Gefrierschnitten zeigten auch hier die Expression der tektalen Proteine und eine klar laminare Organisation der Zellen des ektopischen Gewebes. Die Laminierung schien im Vergleich zum ektopischen Tektum in E 7,5 Tage alten Embryos weiter entwickelt zu sein, wie anhand von zusätzlichen und differenzierteren Schichten zu erken-nen war. Die Laminierung glich weitgehend der zellulären Organisation des wildtypischen Tektums der entsprechenden Entwicklungsstufe (Abb. 19B, C).

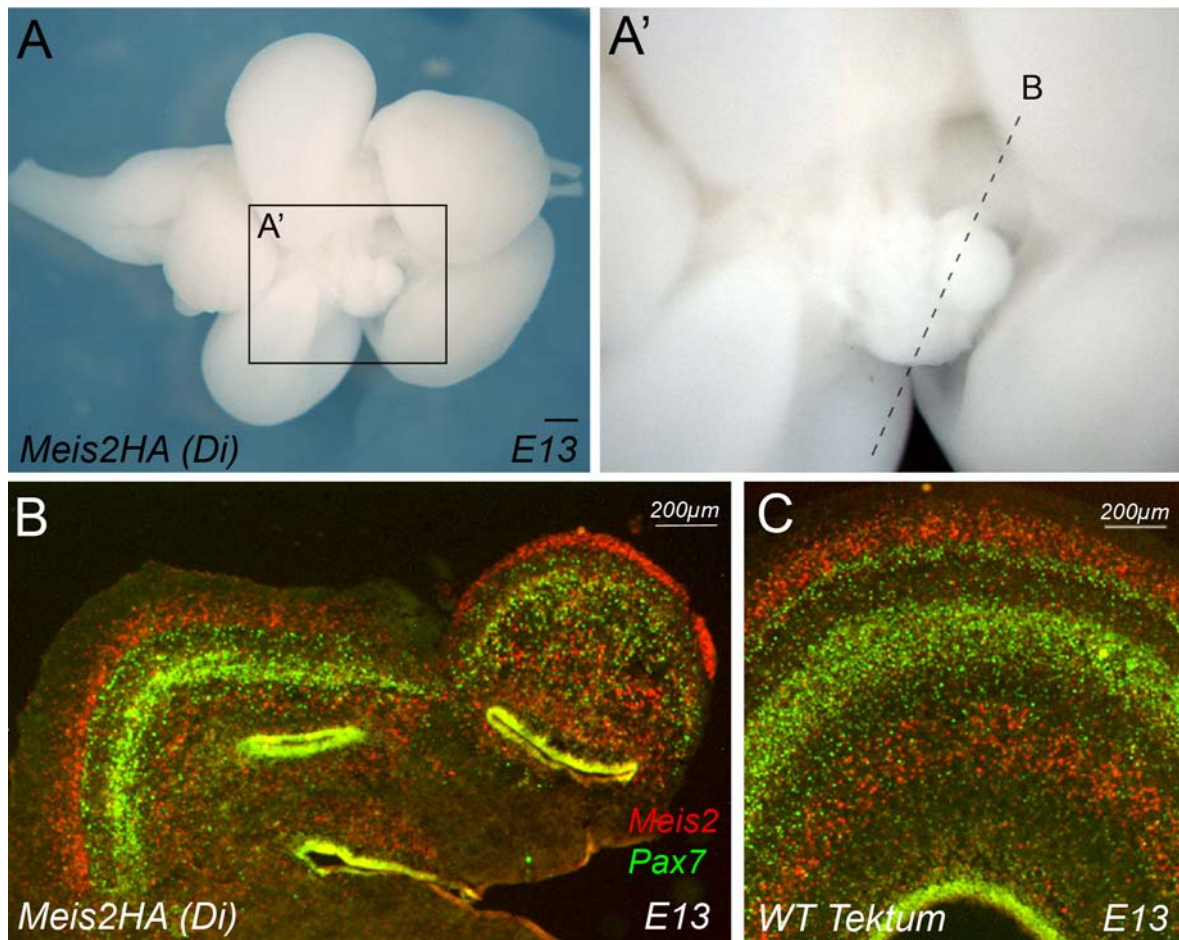


Abbildung 19: Ektopische tektale Strukturen 11,5 Tage nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. (A) Vom umgebenden mesenchymalen Gewebe isoliertes Gehirn 11,5 Tage nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. (A') Vergrößerung des in (A) umrandeten Bereichs der ektopischen Struktur im Dienzephalon. (B, C) Immunfärbung von Meis2 und Pax7 auf Gefrierschnitten durch den in A' gekennzeichneten Bereich (B) und des wildtypischen Tektums im entsprechenden Entwicklungsstadium (C). Di: Dienzephalon; WT: Wildtyp. Maßstab: A: 1 mm; B, C: 200 µm.

Die hier beschriebenen Versuche zeigten, dass die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon die Entstehung eines ektopischen Tektums induzieren kann. Es kam zur Entwicklung tektumspezifischer Strukturen und zur Expression tektaler Markerproteine. Einhergehend mit der Entstehung des ektopischen Tektums kam es durch die Expression von *Meis2HA* zu einer Schicksalsänderung des dienzephalischen Gewebes, wie zusätzlich durch das Fehlen eines dienzephalischen Markers im ektopischen Gewebe gezeigt werden konnte.

3.3.6 Meis2 induziert kein ektopisches Tektum im Metenzephalon

Die Fehlexpression von *Meis2HA* führte zur Entwicklung tektaler Strukturen im Diencephalon. Daher wurde untersucht ob die Fehlexpression von *Meis2HA* im Metenzephalon auch zu einer Induktion bzw. zu der Entstehung eines ektopischen Tektums führen kann. Dazu wurde *Meis2HA* im Metenzephalon fehlexprimiert. Im Vergleich zu einem wildtypischen Gehirn bei E 7,5 waren 6 Tage nach Transfektion von *Meis2HA* in die entsprechende Region, keine phänotypischen Veränderungen in den Gehirnen erkennbar (Abb. 20B, B'; 20A, A'). Also führte die Fehlexpression von *Meis2HA* im Metenzephalon nicht zur Entwicklung eines ektopischen Tektums (Abb. 20A, A', n = 2).

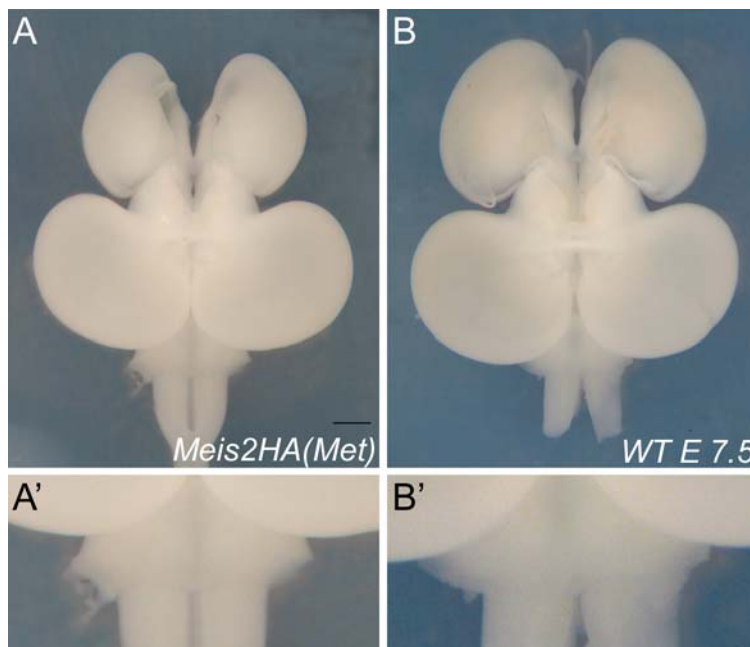


Abbildung 20: Fehlexpression von *Meis2HA* im Metenzephalon induziert keine ektopischen tektalen Strukturen. Vom umgebenden mesenchymalen Gewebe isoliertes Gehirn 6 Tage nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Metenzephalon (A) und eines wildtypischen Embryos im entsprechenden Entwicklungsstadium von E 7,5 (B). (A', B') zeigen vergrößerte Ausschnitte des Zerebellums aus A bzw. B. Met: Metenzephalon; WT: Wildtyp. Maßstab A, B: 1 mm.

Die Möglichkeit von Meis2 ein ektopisches Tektum außerhalb seiner eigentlichen Expressionsdomäne zu induzieren scheint somit auf Regionen anterior des Mittelhirns beschränkt zu sein. Die Induktion eines ektopischen Tektums durch *Meis2HA* verhält sich demnach so wie die Induktion des tektalen Markergens *ephrinB1*. Letzteres konnte, wie im Kapitel 3.3.3 beschrieben, auch nur im anterior gelegenen Diencephalon, nicht jedoch im Metenzephalon beobachtet werden. Meis2 kann somit wichtige Funktionen auch außerhalb seiner Expressionsdomäne ausüben. Dafür scheint es jedoch eine Art Permissivität des Gewebes zu erfordern, welche nur im Diencephalon nicht aber im Metenzephalon gegeben

ist. Zusammengefasst lassen diese Versuche nun die Schlussfolgerung zu, dass *Meis2* während der Entwicklung des optischen Tektums eine wichtige Rolle ausübt: in einem entsprechend permissiven Gewebe kann durch die Expression von *Meis2* tektales Schicksal festgelegt werden.

3.3.7 Weitere Analysen zum Einfluss von *Meis2* auf das Zellschicksal im anterioren Neuralrohr

Meis2 ist also in der Lage, im Dienzephalon tektales Schicksal festzulegen und die Entwicklung eines ektopischen Tektums zu induzieren. Ein erster Hinweis auf eine *Meis2*-bedingte Schicksalsänderung war bereits 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* durch die Induktion von *ephrinB1* zu beobachten. Die Festlegung eines Zell- oder Gewebeschicksals geht jedoch auch einher mit der Unterdrückung eines anderen Schicksals, also der Unterdrückung von Markergenen der entsprechenden Regionen. Eine Unterdrückung dienzecephalischer Identität wurde hier zuvor an Embryos 6 Tage nach Fehlexpression von *Meis2HA* durch den Verlust von *Pax6* im ektopischen Gewebe im Dienzephalon beschrieben. Dies brachte jedoch die Frage auf, in welchem Zeitrahmen *Meis2* eine Schicksalsänderung des transfizierten Gewebes bewirkt.

Um dies zu untersuchen, wurde *Meis2HA* erneut im Dienzephalon fehlexprimiert. Die Embryos wurden 24 h nach Elektroporation geerntet und mittels *in situ* Hybridisierung wurde anschließend die Expression von *Pax6* untersucht. *Pax6* wird im anterioren Neuralrohr exprimiert und seine Expression im Dienzephalon grenzt posterior scharf an das Mittelhirn. Somit kennzeichnet *Pax6* dienzecephalisches, jedoch nicht mesenzecephalisches Gewebe. Überdies ist *Pax6* ein wichtiger Faktor bei der Festlegung dienzecephalischen Schicksals (Araki und Nakamura, 1999; Schwarz et al., 1999; Matsunaga et al., 2000; Kimura et al., 2005). Die Fehlexpression von *Meis2HA* führte bereits 24 h nach Elektroporation zu einer Unterdrückung von *Pax6*-Expression im Dienzephalon (Abb. 21A – C; n = 5). Folglich bewirkt *Meis2*-Expression innerhalb von 24 h nach Elektroporation eine Repression des dienzecephalischen Charakters.

Da *Meis2* im Dienzephalon tektales Zellschicksal festlegen kann, besteht umgekehrt die Möglichkeit, dass die Unterdrückung der *Meis2*-Funktion im Mittelhirn zu einem Verlust des mesenzecephalischen Zellschicksals führt. Dies könnte zur Folge haben, dass die Zellen des Mittelhirns ein anderes Schicksal, beispielsweise das Schicksal eines benachbarten

Gewebes annehmen. Um dies zu untersuchen, wurde *Meis2Enr* erneut im Mittelhirn fehl-exprimiert und zunächst die Expression des dienzephalischen Markers *Pax6* überprüft. Im Mittelhirn war 24 h nach Fehlexpression von *Meis2EnR*, wie auch in der wildtypischen Kontrolle, keine *Pax6*-Expression zu sehen (Abb. 21A, D – F; n = 12). Eine Doppel-*in situ* Hybridisierung mit einem zusätzlichen Nachweis für *GFP*-Transkripte bestätigte das Vorhandensein der entsprechenden Konstrukte im Mittelhirn (Abb. 21E). Die Unterdrückung der *Meis2*-Funktion hatte demnach keine Induktion von *Pax6*-Expression im Mittelhirn zur Folge. *Meis2* kann also zwar innerhalb von 24 h dienzephalisches Zellschicksal unterdrücken und tektale Differenzierung hervorrufen. Der Funktionsverlust von *Meis2* im Mittelhirn führte jedoch, zumindest im gleichen Zeitrahmen, nicht zu einer mes- zu dienzephalischer Transformation.

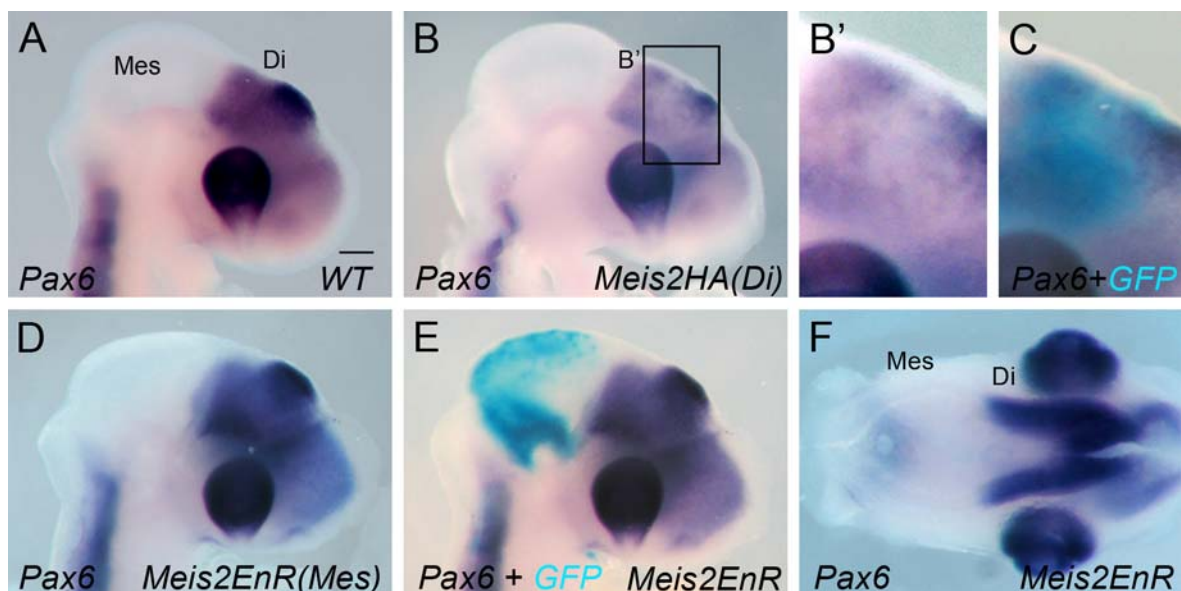


Abbildung 21: Fehlexpression von *Meis2* im Diensephalon unterdrückt *Pax6*, die Fehlexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn führt nicht zu einer Induktion von *Pax6*. *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos mit einer Sonde gegen *Pax6* im wildtypischen Embryo (A), 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Diensephalon (B – C) und 24 h nach Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn (D – F). (C, E) Doppel-*in situ* Hybridisierung von *GFP* zum Nachweis der elektroporierten Bereiche. (B') Vergrößerter Ausschnitt des in B gekennzeichneten Bereiches. (F) Aufsicht auf einen Embryo nach Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn. Mes: Mesenzephalon; Di: Diensephalon; WT: Wildtyp. Maßstab: A, B, D – F: 200 µm.

Um die Möglichkeit zu testen, dass die Unterdrückung der *Meis2*-Funktion zu einer Transformation des mesenzephalischen Gewebes in metenzephalisches Gewebe führt, wurden nach Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn *in situ* Hybridisierungen mit

zwei frühen Markergenen des Metenzephalons, *cAth1* und *Irx2* durchgeführt (Ben Arie et al., 1997; Matsumoto et al., 2004). *Meis2EnR* führte 24 h nach Elektroporation weder zu einer Induktion von *cAth1* (Abb. 22A – B''); n = 4) noch zu einer Induktion von *Irx2* (Abb. 22C – D''); n = 5) im Mittelhirn. *In situ* Hybridisierungen mit einer *GFP*-Sonde zeigten jedoch das Vorhandensein der elektroporierten Konstrukte im Mittelhirn (Abb. 22B', D'). Somit scheint die Unterdrückung der *Meis2*-Funktion, zumindest innerhalb von 24 h, nicht dazu zu führen, dass mesenzephalisches Gewebe ein metenzephalisches Zellschicksal annimmt.

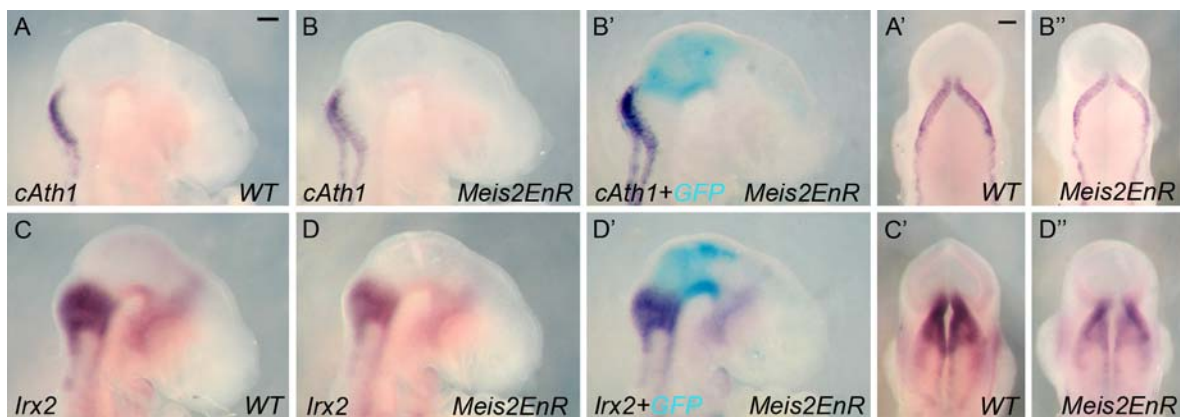


Abbildung 22: Die Unterdrückung von *Meis2*-Funktion im Mittelhirn führt nicht zur Induktion von *cAth1* oder *Irx2*. *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos mit RNA-Sonden zum Nachweis der metenzephalischen Markergene *cAth1* (A – B'') und *Irx2* (C – D'') in wildtypischen Embryos (A, A', C, C') und 24 h nach Fehlexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn (B – B'', D – D''). (B', D') Doppel-*in situ* Hybridisierung der entsprechenden, in B und D gezeigten Embryos mit einer *GFP*-Sonde zum Nachweis der elektroporierten Bereiche. (A', B'', C', D'') Rückansicht der entsprechenden in A, C und der in B, D gezeigten Embryos. Maßstab: A – B', C – D': 200 µm; A', B'', C', D'': 200 µm.

Meis2 wird im Mittelhirn von Beginn an vorwiegend in den dorsalen Alarplatten des mesenzephalischen Vesikels exprimiert. Um zu überprüfen, ob *Meis2* einen Einfluss auf die Genexpression der ventralen Basalplatten, dem zukünftigen Tegmentum, hat wurde *Meis2HA* in diesem Bereich fehlexprimiert. Anschließend wurden *in situ* Hybridisierungen mit einer spezifischen Sonde gegen *Nkx6.1*, einem ventralen Markergen, durchgeführt (Qiu et al., 1998). 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im ventralen Mittelhirn war keine Veränderung der *Nkx6.1*-Expression zu erkennen (Abb. 23; n = 6).

Die Anwesenheit der elektroporierten Konstrukte im ventralen Mittelhirn wurde in jedem Fall durch einen Nachweis von *GFP*-Transkripten sichtbar gemacht (Abb. 23A'). Wie anhand eines flach präparierten Mittelhirns genauer zu sehen war, unterschied sich die

Expression von *Nkx6.1* auf der *GFP*-positiven elektroporierten Seite nicht von der linken nicht elektroporierten Seite des Mittelhirns (Abb. 23B). Die Fehlexpression von *Meis2HA* führte also innerhalb von 24 h nicht zu einer Unterdrückung der *Nkx6.1*-Expression. Daher kann also davon ausgegangen werden, dass die *Meis2*-Expression nicht ausreicht, um, zumindest im untersuchten Zeitrahmen, tegmentales Schicksals zu verändern.

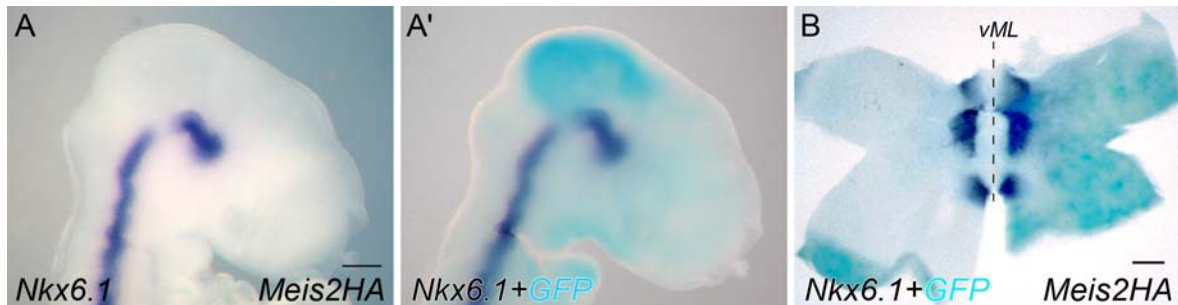


Abbildung 23: Die Fehlexpression von *Meis2* im ventralen Mittelhirn verändert nicht die *Nkx6.1*-Expression. (A – B) *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im ventralen Mittelhirn mit einer Sonde zum Nachweis des ventralen Mittelhirnmarkers *Nkx6.1*. (A') Doppel-*in situ* Hybridisierung mit einer *GFP*-Sonde zeigt den Bereich des elektroporierten Gewebes im gleichen Embryo. (B) Flachpräpariertes Mittelhirn zeigt auch in elektroporierten Bereichen keine Veränderungen in der Expression von *Nkx6.1*. vML: ventrale Mittellinie. Maßstab: A, A': 200 µm; B: 200 µm.

Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass die Festlegung tektalen Schicksals durch *Meis2* im Dienzephalon innerhalb von 24 h stattfindet. Also kommt es, einhergehend mit der Induktion des tektalen Markers *ephrinB1* (Kapitel 3.3.3), zu einer Unterdrückung des dienzecephalischen Markers *Pax6*. Im Gegensatz dazu konnte *Meis2HA*-Transfektion weder im ventralen Mesenzephalon noch wie zuvor in Kapitel 3.3.3 bereits beschrieben, im Metenzephalon Veränderungen der Genexpression bewirken, die auf eine Induktion tektaler Charakteristika hinweisen würden. Diese Versuche sprechen also weiterhin für die Vermutung, dass allein das dorsale Neuralrohr anterior der Mittel-Hinterhirn Grenze permissiv für die Funktion von *Meis2* ist. Des Weiteren führte die Unterdrückung der *Meis2*-Funktion im Mesenzephalon weder zu einer Induktion dienzecephalischer noch zu einer Induktion metenzecephalischer Charakteristika. Die strukturellen Veränderungen nach *Meis2EnR*-Transfektion, wie sie beispielsweise in Abbildung 12 dargestellt sind, spiegeln damit zwar vermutlich einen Verlust tektaler Merkmale wider. Dies geht jedoch vermutlich nicht mit einer Transformation des Gewebes in andere Hirnstrukturen einher.

3.3.8 Die Induktion tektaler Strukturen durch Meis2 erfolgt unabhängig von der positiven Rückkopplungsschleife des MHO

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche zeigten zwar, dass Meis2 tektale Entwicklung induzieren kann. Sie geben jedoch keinen Aufschluss darüber, wie Meis2 diese wichtige Funktion während der Entwicklung des optischen Tektums ausübt. Ein erster Schritt zur Analyse dieses Sachverhalts ist die Identifizierung weiterer möglicher Zielgene von Meis2. Diese Arbeiten hatte ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit begonnen. Hierbei konnte ich zeigen, dass die Expression der tektalen Gene *Pax3*, *Pax5*, *Pax7*, *Otx2*, *Wnt1* und *En1* nicht einer Regulation durch Meis2 unterliegen. Die Überexpression des dominant negativen *Meis2EnR* führte nicht zu einer Veränderung der Expression dieser Gene im Mittelhirn (Agoston, Diplomarbeit 2005).

Um diese Versuche zu ergänzen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Fehlexpressionsstudien durchgeführt und darauf folgend die Expression weiterer im Mittelhirn exprimierter Gene untersucht. Die Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn führte nach 24 h auch nicht zu einer Veränderung der Expression von *Pax2*, *En2* und *Wnt3a* (*Pax2*: Abb. 24A – B; n = 4; *En2*: Abb. 24C, C'; n = 7; *Wnt3a*: Abb. 24E, E'; n = 5). Doppel-*in situ* Färbungen mit einer entsprechenden Sonde für das untersuchte Gen und einer Sonde für *GFP* zeigten die Anwesenheit der elektroporierten Konstrukte im Mittelhirn (Abb. 24A' – B; C', D', E', F'). Die Expression der genannten Gene unterschied sich in den elektroporierten Bereichen nach Transfektion mit *Meis2EnR* nicht von der jeweiligen linken, nicht elektroporierten Seite des Embryos oder von Embryos, die mit dem *Kontroll-EnR* Konstrukt elektroporiert wurden (*Pax2*: Abb. 24B; *En2*: Abb. 24D, D', n = 4; *Wnt3a*: Abb. 24F, F', n = 3). Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass Meis2 die Expression der im Mittelhirn exprimierten Gene, wie *Pax2/3/5/7*, *En1/2*, *Wnt1/3a* und *Otx2* nicht reguliert.

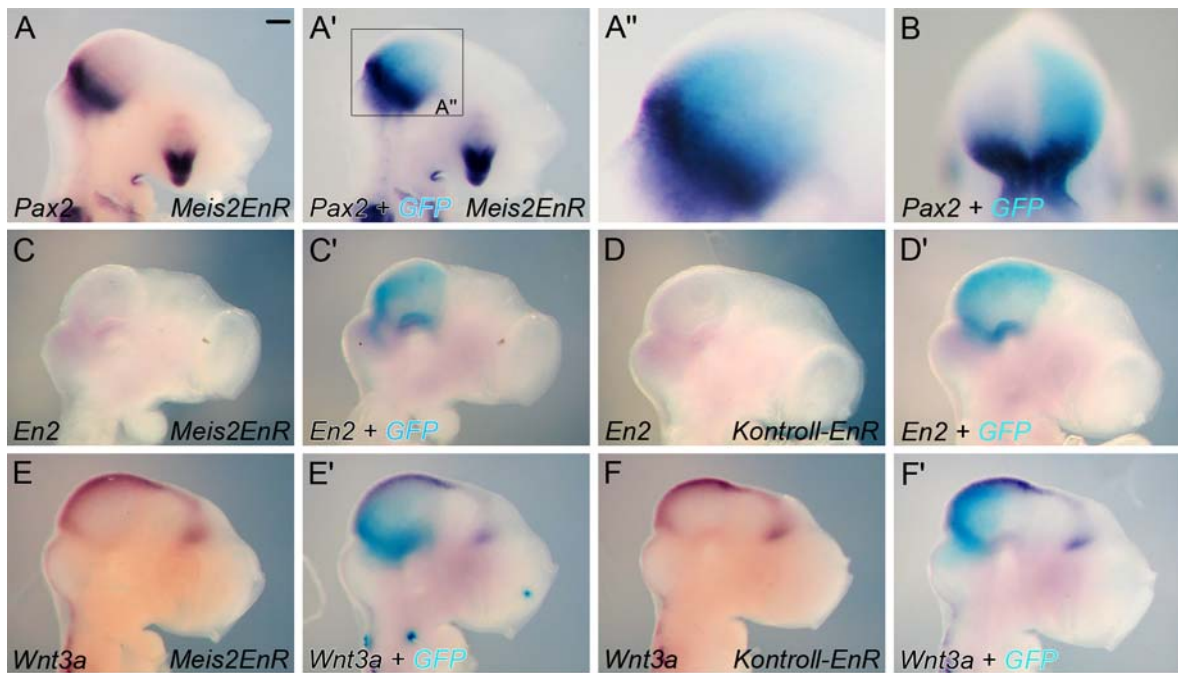


Abbildung 24: Die Fehlexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn hat keinen Einfluss auf die Expression der tektalen Gene *Pax2*, *En2* und *Wnt3a*. *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos mit spezifischen Sonden für *Pax2* (A – B), *En2* (C – D') und *Wnt3a* (E – F') zeigen keine Veränderungen der Expressionsdomänen 24 h nach Überexpression von *Meis2EnR* (A – B, C, C', E, E') oder eines *Kontroll-EnR* (D, D', F, F') Konstruktes im Mittelhirn. (A'', B, C', D', E', F') Zweitfärbungen der in A, C, D, E und F gezeigten Embryos mit einer *GFP*-Sonde zum Nachweis der elektroporierten Bereiche. (A'') Vergrößerter Ausschnitt des in A' gekennzeichneten Bereiches. (B) Rückansicht des in A' gezeigten Embryos. Maßstab: 200 µm.

Die Regulation zahlreicher im Mittelhirn exprimierter Faktoren unterliegt, wie bereits ausführlich in der Einleitung erwähnt, der organisatorischen Aktivität des MHO. *Pax2/3/5/7*, *En1/2*, *Wnt1* und *Fgf8* sind alle Teil einer positiven Rückkopplungsschleife, die für die Entwicklung mittel- und hinterhirnspezifischer Strukturen unabkömmlich ist (Wurst und Bally-Cuif, 2001; Martinez, 2001; Nakamura et al., 2005). Überdies kann die Fehlexpression jeder der MHO-assoziierten Faktoren im Dienzephalon ektopische tektale Strukturen induzieren, da als Konsequenz dieser positiven Rückkopplungsschleife die Fehlexpression eines dieser Faktoren immer auch die Expression anderer am MHO beteiligten Faktoren induziert (Crossley et al., 1996; Sugiyama et al., 1998; Araki und Nakamura, 1999; Funahashi et al., 1999; Okafuji et al., 1999; Matsunaga et al., 2001). Dabei ist wichtig, dass die Fehlexpression von MHO-assoziierten Faktoren immer auch mit einer Induktion von *Fgf8*, dem Schlüsselmolekül für die organisatorische Aktivität des MHO, einhergeht (Crossley et al., 1996). Aufgrund dieses Mechanismus entsteht durch Fehlexpression eines an der Funktion des MHO beteiligten Moleküls, ein kompletter, molekularer MHO, was die Entstehung ektopischer tektaler Strukturen ermöglicht.

Somit wäre also eine Möglichkeit, dass *Meis2* auch ein Bestandteil dieser positiven Rückkopplungsschleife ist und die Entwicklung eines ektopischen Tektums über die Induktion eines ektopischen MHO im Dienzephalon steuert. Um dies zu testen, wurde *Meis2HA* im Dienzephalon fehlexprimiert und anschließend die Expression von am MHO beteiligten Faktoren untersucht.

Abbildung 25 zeigt *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon mit spezifischen Sonden zum Nachweis von *Pax2*-, *Enl*- oder *Fgf8*-Expression. Zusätzlich wurden in jedem Fall auch *GFP*-Transkripte nachgewiesen, um jeweils den elektroporierten Bereich sichtbar zu machen (Abb. 25B, B', D, D', F, F'). Wie diese Doppel-*in situ* Hybridisierungen bestätigen, wurden die elektroporierten Konstrukte im Dienzephalon stets weitflächig exprimiert (Abb. 25B, B', D, D', F, F'). Es konnten hier jedoch nach *Meis2HA*-Fehlexpression weder ektopische *Pax2*-, *Enl*-Transkripte noch ektopische *Fgf8*-Transkripte im Dienzephalon nachgewiesen werden. Dies wird anhand von vergrößerten Ausschnitten des Dienzephalons der jeweiligen Embryos noch deutlicher (Abb. 25A', C', D'). Die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon führte also 24 h nach Elektroporation nicht zu einer Induktion von *Pax2*, *Enl* oder *Fgf8* (*Pax2*: n = 4, *Enl*: n = 5, *Fgf8*: n = 5).

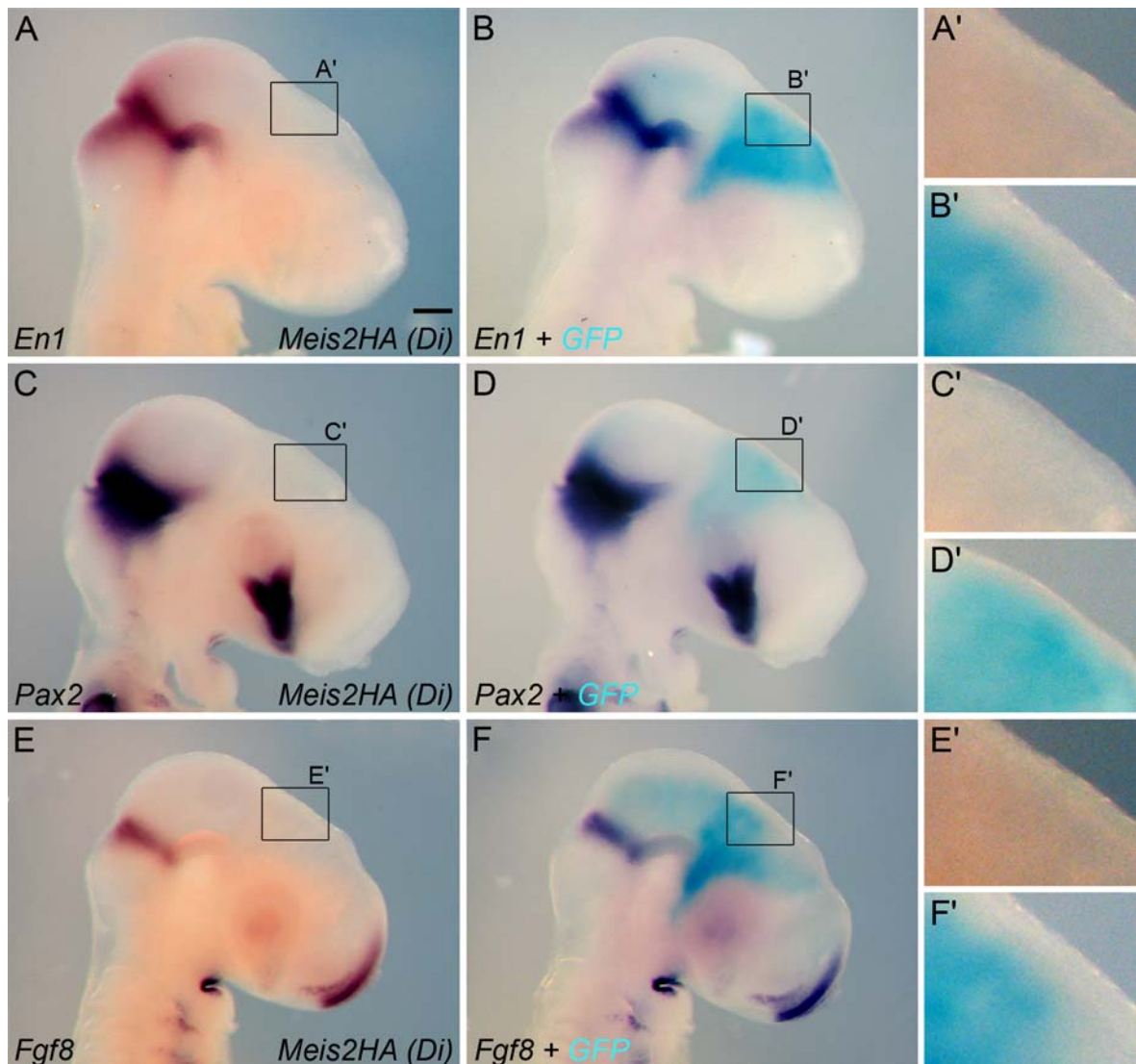


Abbildung 25: Die Fehlexpression von *Meis2* im Dienzephalon führt nicht zur Induktion der MHO-assoziierten Gene *En1*, *Pax2* und *Fgf8*. (A – F') *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos mit Sonden für *En1* (A – B'), *Pax2* (C – D') und *Fgf8* (E – F') 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. (B, B', D, D', F, F') Doppel-*in situ* Hybridisierungen mit einer *GFP*-Sonde der in A, C und E gezeigten Embryos zum Nachweis der elektroporierten Bereiche. (A' – F') Vergrößerte Ausschnitte der in A – F umrandeten Bereiche. Di: Dienzephalon. Maßstab: 200 µm.

Untersuchungen von Matsunaga und Kollegen (2001) hatten gezeigt, dass auch die Fehlexpression von *Pax3* oder *Pax7* im Dienzephalon ein ektopisches Tektum induzieren kann. Die Entstehung des ektopischen Gewebes geht jedoch auch hier mit der Induktion von Genen des MHO einher. Eine schwache Induktion von *Fgf8* konnte bereits 12 h nach Transfektion von *Pax7HA* ins Dienzephalon beobachtet werden. Darüber hinaus war 18 h nach Elektroporation auch eine schwache Induktion von *Pax3* und bereits eine starke ektopische Expression von *Fgf8* zu sehen (Matsunaga et al., 2001).

Daher wurde überprüft, ob die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon die Expression von *Pax3* und *Pax7* induziert. Doppel-*in situ* Hybridisierungen mit Sonden für *Pax3* und *GFP* bestätigten zwar das Vorhandensein der elektroporierten Konstrukte im Dienzephalon, es konnten hier jedoch 24 h nach Elektroporation von *Meis2HA* keine ektopischen *Pax3*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 26A – B'; n = 5). Auch waren keine Veränderungen der *Pax7*-Expression 48 h nach Elektroporation von *Meis2HA* im Dienzephalon zu sehen, obwohl die elektroporierten Konstrukte auch hier weitflächig exprimiert wurden. Das Vorhandensein der elektroporierten Konstrukte wurde hierbei durch einen Nachweis des GFP-Proteins gezeigt (Abb. 26C – D'; n = 6).

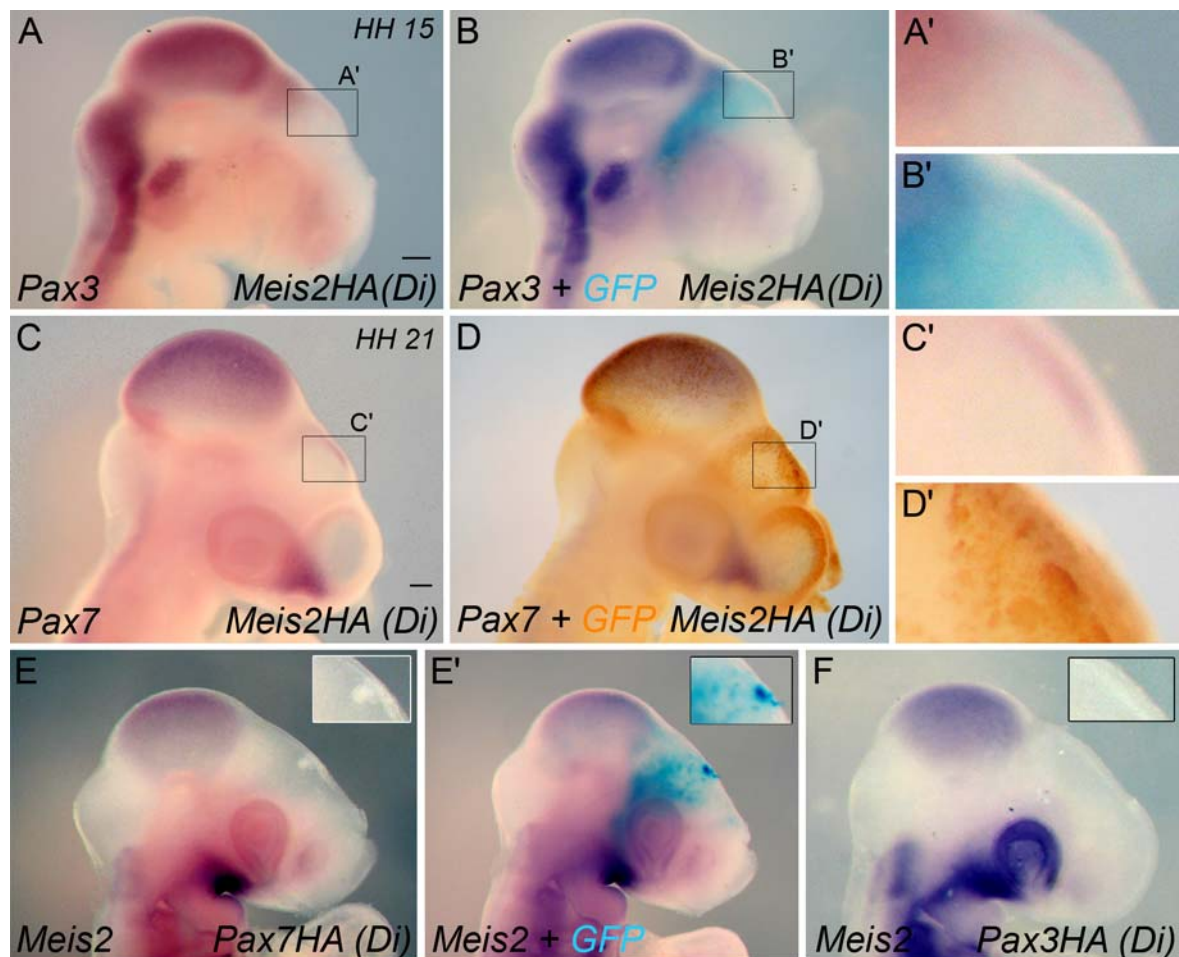


Abbildung 26: Keine Induktion von *Pax3* und *Pax7* nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon und keine Induktion von *Meis2* nach Fehlexpression von *Pax3HA* oder *Pax7HA*. (A – B') *Pax3*-Expression 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. (B) Zweitfärbung am in A gezeigten Embryo mit einer *GFP*-Sonde zum Nachweis des elektroporierten Bereiches. (A', B') Vergrößerte Ausschnitte der in A und B gekennzeichneten Bereiche. (C – D') *Pax7* Expression 48 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. (D) Zweitfärbung am in C gezeigten Embryo mit einem *GFP*-Antikörper zum Nachweis des elektroporierten Bereiches. (C', D') Vergrößerte Ausschnitte der in C und D gekennzeichneten Bereiche. (E, E') *Meis2*-Expression 24 h nach Fehlexpression von *Pax7HA* im Dienzephalon. (E') Der in E gezeigte Embryo nach Doppel-*in situ* Hybridisierung mit einer *GFP*-Sonde zum Nachweis der elektroporierten Bereiche. (F) *Meis2*-Expression 24 h nach Fehlexpression von *Pax3HA* im Dienzephalon. Di: Dienzephalon. Maßstab: A, B, E – F: 200 µm; C, D: 200 µm.

Um die Möglichkeit zu testen, dass Pax3 oder Pax7 ihrerseits die Expression von *Meis2* induzieren können, wurde die jeweilige kodierende Sequenz von Pax3 oder Pax7 fusioniert an einen HA-„Tag“ im Dienzephalon fehlexprimiert (*Pax7HA* und *Pax3HA*). Die Embryos wurden 24 h später auf die Expression von *Meis2* hin analysiert. Hier konnte jedoch in keinem Fall eine Veränderung der *Meis2*-Expression im Dienzephalon beobachtet werden. Doppel-*in situ* Hybridisierungen mit einer zusätzlichen *GFP*-Sonde wiesen die elektroporierten Konstrukte im Dienzephalon nach Fehlexpression von *Pax7HA* nach (Abb. 26E'). Hier konnten jedoch weder nach Fehlexpression von *Pax7HA* noch nach Fehlexpression von *Pax3HA* *Meis2*-Transkripte im Dienzephalon beobachtet werden (Abb. 26E – E', *Pax7HA*: n = 7, *Pax3HA*: n = 7).

Zusammenfassend zeigten diese Experimente also, dass *Meis2HA* im Dienzephalon die Expression keines der an der positiven Rückkopplungsschleife des MHO beteiligten Gene *Pax2*, *En1*, *Fgf8*, *Pax3* und *Pax7* innerhalb von 24 h bis 48 h nach Elektroporation induziert. Diese Befunde, zusammen mit vorangegangenen Experimenten unter Verwendung des dominant negativ wirkenden *Meis2EnR*-Konstruktes, weisen darauf hin, dass *Meis2* nicht in der positiven Rückkopplungsschleife des MHO involviert ist: Die Expression der untersuchten Gene wurde weder durch *Meis2EnR* im Mittelhirn unterdrückt, noch kam es zur *Meis2*-bedingten Induktion dieser Gene im Dienzephalon.

Unter den hier untersuchten Molekülen spielt vor allem *Fgf8* eine wichtige Rolle für die organisatorische Aktivität des MHO. Für die Induktion eines ektopischen MHO ist die Induktion von *Fgf8* unumgänglich (Martinez, 2001). Daher wurden für eine detailliertere Analyse der *Fgf8*-Expression *in situ* Hybridisierungen auf koronalen Vibratomschnitten durchgeführt. Diese Untersuchungen bestätigten die vorangegangenen Befunde an ganzen Embryos. Obwohl auf der elektroporierten Seite des Dienzephalons eine massive ektopische Expression von *Meis2* vorlag, waren in einem benachbarten Schnitt im selben Bereich keine *Fgf8*-Transkripte vorhanden (Abb. 27B, A; n = 4 Embryos). Hier war nur die starke, endogene *Fgf8*-Expression in den Anlagen der Retinae zu sehen (Vogel-Hopker et al., 2000). Dass es sich in Abbildung 27B um ektopische *Meis2*-Expression handelt, war gut im Vergleich zur wildtypischen *Meis2*-Expression in einem Embryo des entsprechenden Entwicklungsstadiums zu erkennen. Dort waren keine *Meis2*-Transkripte im Dienzephalon nachzuweisen (Abb. 27C). Als Kontrolle wurde *GFP* im Dienzephalon über-

exprimiert, was mittels einer *GFP*-Sonde nachgewiesen wurde (Abb. 27E). Hier war ebenfalls keine Induktion einer *Fgf8*-Expression im Dienzephalon zu sehen (Abb. 27D; n = 3).

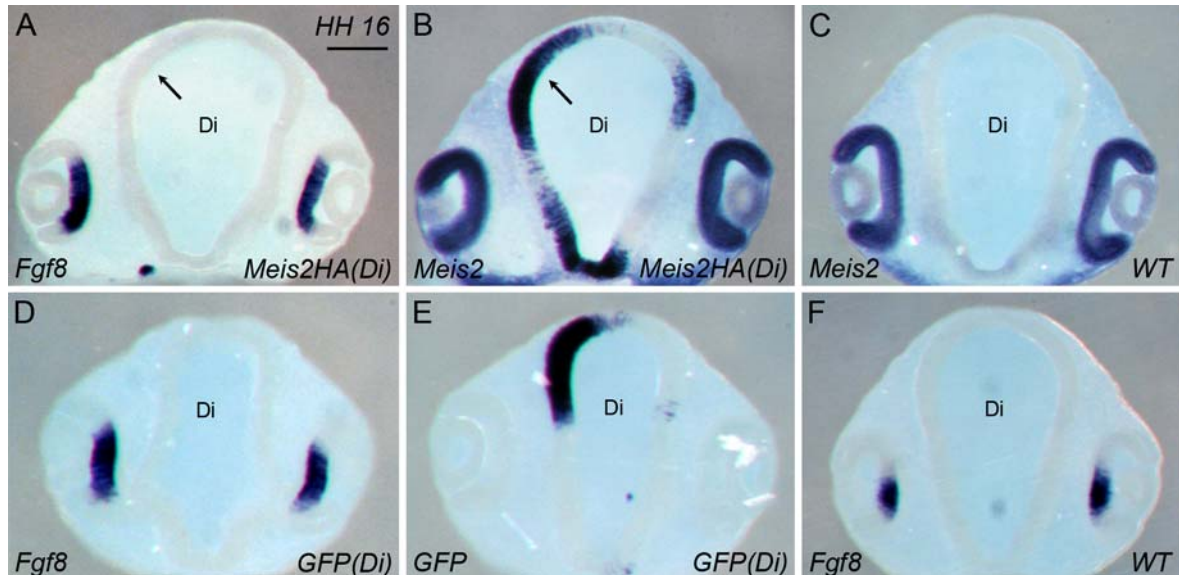


Abbildung 27: Keine Induktion von *Fgf8* 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. (A – F) *In situ* Hybridisierungen auf koronalen Vibratomschnitten zeigen die Expression von *Fgf8* (A) und *Meis2* (B) 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. Der Pfeil in B weist auf die starke ektopische Expression von *Meis2*. Der Pfeil in A zeigt im benachbarten Schnitt auf den elektroporierten Bereich, in welchem jedoch keine ektopischen *Fgf8*-Transkripte zu sehen sind. (C) Wildtypische *Meis2*-Expression im entsprechenden Entwicklungsstadium HH 16. Expression von *Fgf8* (D) und *GFP* (E) 24 h nach Fehlexpression von *GFP* als Kontrolle im Dienzephalon. (F) Wildtypische Expression von *Fgf8* im entsprechenden Entwicklungsstadium HH 16. Maßstab: (A – F): 200µm.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass *Meis2* zu einem späteren Zeitpunkt als 24 h nach Elektroporation eine ektopische *Fgf8*-Expression induziert, wurden Embryos unterschiedlicher Stadien nach *Meis2HA*-Fehlexpression im Dienzephalon geerntet. Zunächst wurden benachbarte koronale Vibratomschnitte von Embryos 48 h nach Elektroporation auf die Expression der MHO-Gene *Fgf8*, *Pax2* und *Wnt1* analysiert (Abb. 28). Zur Überprüfung der elektroporierten Bereiche wurde zusätzlich die *Meis2*-Expression nachgewiesen. Es war eine massive, ektopische *Meis2*-Expression im Dienzephalon zu sehen (Abb. 28A', B). In diesen Bereichen waren jedoch weder *Fgf8*- noch *Pax2*-Transkripte oder eine ektopische *Wnt1*-Expression zu beobachten (Abb. 28A, B'', A'', B'). *Wnt1*-Transkripte konnten lediglich in der Dachplatte nachgewiesen werden (Abb. 28B'). *Wnt1* wird in der dorsalen Dachplatte entlang des gesamten Neuralrohrs exprimiert, also auch in der Dachplatte des Dienzephalons (Hidalgo-Sanchez et al., 2005). Es ist also davon

auszugehen, dass es sich bei der hier beobachteten *Wnt1*-Expression um die endogene *Wnt1*-Domäne handelt. In der *GFP*-elektroporierten Kontrolle war eine sehr schwache, endogene *Fgf8*-Domäne zu sehen, die jedoch sehr klein war und sich im anterioren Dienzephalon befand (Abb. 28C). Diese *Fgf8*-Expressionsdomäne im Dienzephalon wurde bereits beschrieben (Crossley et al., 2001). Sie entspricht Domäne F12 von Crossley und Kollegen (2001). Da nach Fehlexpression von *Meis2HA* keine ektope Expression der hier untersuchten Gene beobachtet werden konnte ist davon auszugehen, dass *Meis2HA* im Dienzephalon auch 48 h nach Fehlexpression nicht zur Induktion der MHO-Gene *Fgf8*, *Pax2* und *Wnt1* geführt hat.

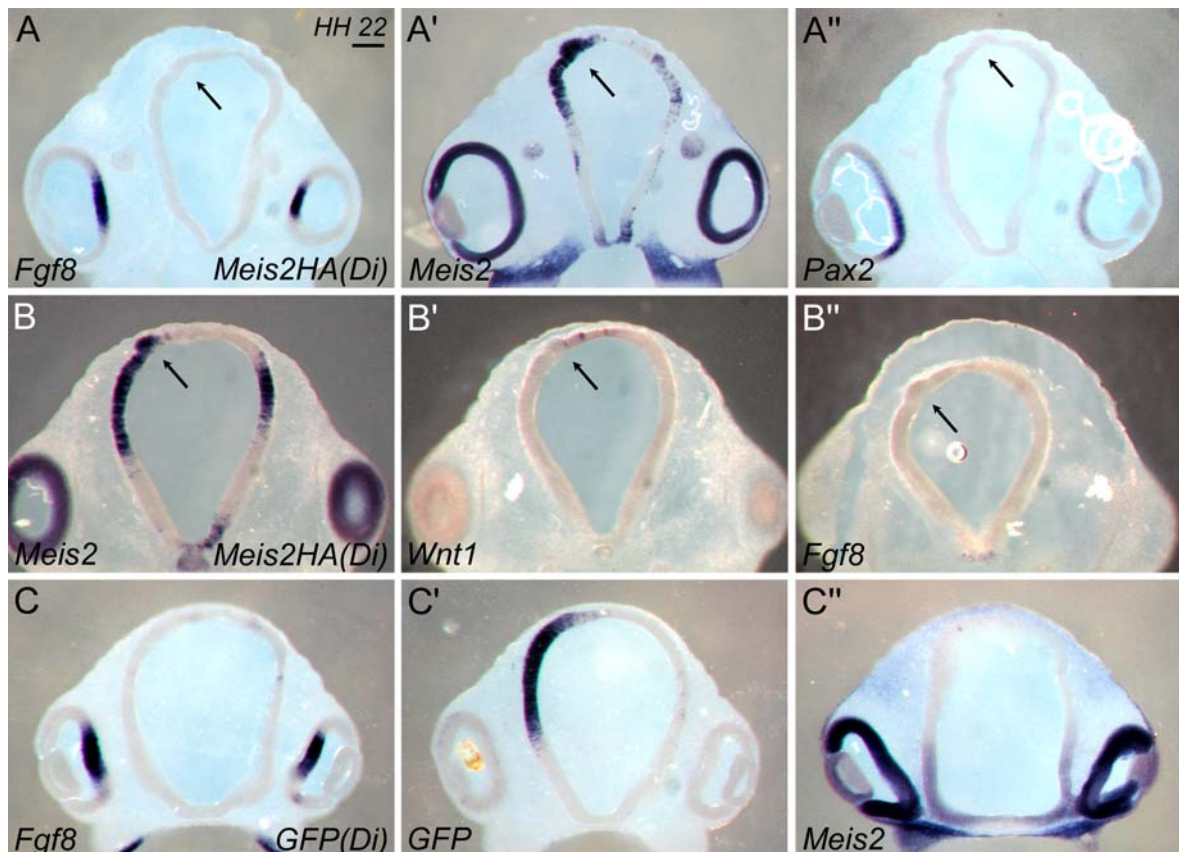


Abbildung 28: Keine Induktion von *Fgf8*, *Pax2* und *Wnt1* 48 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. (A – B'') *In situ* Hybridisierungen auf koronalen Vibratomschnitten zeigen die Expression von *Fgf8* (A, B'', n = 6 Embryos), *Meis2* (A', B, n = 6 Embryos), *Pax2* (A'', n = 3 Embryos) und *Wnt1* (B', n = 3 Embryos) 48 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon. (C – C'') Expression von *Fgf8* (C), *GFP* (C') und *Meis2* (C'') 48 h nach Fehlexpression von *GFP* im Dienzephalon als Kontrolle. Die Pfeile in A – B'' zeigen auf den bereits in diesen Stadien erkennbaren ektopischen Auswuchs im elektroporierten Bereich, welcher in der *GFP*-Kontrolle nicht zu beobachten war. Di: Dienzephalon. Maßstab A – C'': 200 μ m.

Interessanterweise war bereits in diesem Stadium, also 48 h nach Fehlexpression von *Meis2HA*, im Bereich der massiven ektopischen *Meis2*-Expression, ein kleiner, ektopischer Gewebeauswuchs im Dienzephalon zu erkennen (Abb. 28A', B). Dieses konnte im Kontrollexperiment nach Fehlexpression von *GFP* nicht beobachtet werden (Abb. 28C'). Für die *in situ* Hybridisierungen wurden benachbarte Schnitte mit unterschiedlichen Sonden gefärbt. Daher kann man gut erkennen, dass sich in den Bereichen des ektopischen Auswuchses und trotz der massiven *Meis2*-Expression weder *Fgf8*, oder *Pax2* noch *Wnt1* Transkripte befanden. Diese Befunde zeigen, dass die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon die Expression von *Fgf8*, *Pax2* und *Wnt1* auch innerhalb von 48 h nicht induzierte, obwohl zu diesem Zeitpunkt bereits der Ansatz einer ektopischen tektalen Struktur zu erkennen war.

Diese ektopische Struktur war auch stets 72 bzw. 96 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon zu sehen. Sie erschien zudem, im Vergleich zur ektopischen Struktur 48 h nach Elektroporation, größer (Abb. 29; 72 h: 2 Embryos; 96 h: 4 Embryos). Allerdings konnte nach Analyse der *Fgf8*- und *Wnt1*-Expression auf koronalen Vibratomschnitten, auch hier keine ektopische Expression dieser Gene nachgewiesen werden (Abb. A', C, C''). Expressionsanalysen auf benachbarten Vibratomschnitten bestätigten stets eine massive *Meis2*-Expression in den Bereichen der ektopischen Strukturen (Abb. 29A, C'). Hier waren jedoch keine *Fgf8*- oder *Wnt1*-Transkripte vorhanden. Es waren sowohl bei E 4,5 als auch E 5,5 lediglich die endogenen Expressionsdomänen von *Fgf8* und *Wnt1* im dorsalen Dienzephalon zu erkennen. Die wildtypische endogene Expressionsdomäne von *Fgf8* ist in Abbildung 29B' zu sehen. Somit führte die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon selbst nach 96 h nicht zu einer Induktion von *Fgf8* oder *Wnt1*.

Interessanterweise konnten in diesem Entwicklungsstadium jedoch *En1*-Transkripte im Bereich der ektopischen Struktur nachgewiesen werden (Abb. 29D). Diese waren jedoch nur auf einem von zwei Vibratomschnitten in zwei unterschiedlichen Embryos zu beobachten. Wie oben beschrieben, waren 24 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon keine *En1*-Transkripte nachzuweisen (siehe Abb. 25A – B').

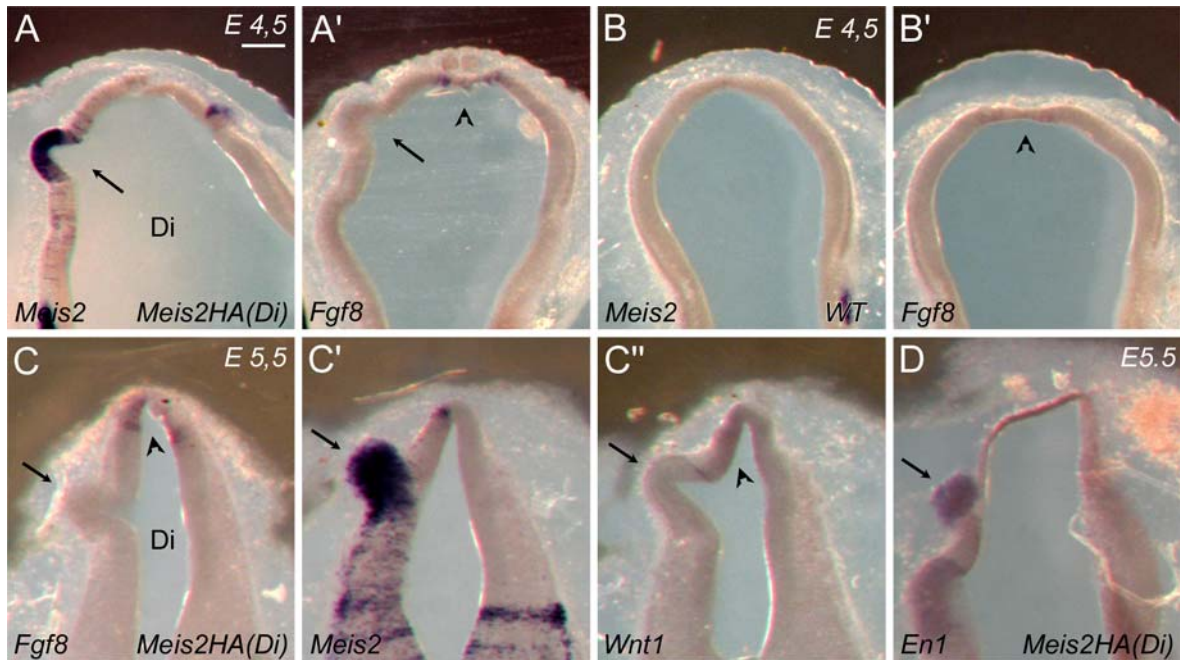


Abbildung 29: Keine Induktion von *Fgf8* und *Wnt1* 72 h und 96 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Diencephalon. (A – D) *In situ* Hybridisierungen auf koronalen Vibratomschnitten zeigen die Expression von *Meis2* (A) und *Fgf8* (A') 72 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Diencephalon. Expression von *Meis2* (B) und *Fgf8* (B') im wildtypischen Embryo im entsprechenden Entwicklungsstadium. Expression von *Fgf8* (C), *Meis2* (C'), *Wnt1* (C'') und *En1* (D) 96 h nach Fehlexpression von *Meis2HA* im Diencephalon. Die Pfeile zeigen auf die ektopischen Strukturen im elektroporierten Bereich des Diencephalons. Die Pfeilspitzen weisen auf endogene *Fgf8*- und *Wnt1*-Expression. Di: Diencephalon, WT: Wildtyp. Maßstab: 200µm.

Darüber hinaus ist bemerkenswert, dass die ektopische *Meis2*-Expression im Diencephalon selbst 96 h nach Fehlexpression des *Meis2HA*-Konstruktes sehr stark war (Abb. 29A, C'). Das *Meis2HA*-Gen befindet sich in einem Expressionsvektor, der nach Elektroporation zwar zur massiven Expression des Transgens führt, jedoch nicht, wie beispielsweise ein retrovirales Konstrukt, stabil in das Genom integriert wird. Folglich kommt es im Laufe von Zellteilungen zu einer Abschwächung der Expression des Transgens. In der Regel werden daher Transgene 4 – 5 Tage nach Elektroporation nicht mehr stark exprimiert (siehe auch Abb. 18F). Die Fehlexpression von *Meis2HA* scheint somit zu einer direkten oder indirekten Induktion von *Meis2* geführt zu haben. Diese Induktion fand nur im Bereich der sich entwickelnden ektopischen Struktur statt, da die Expression in anderen Bereichen bedeutend schwächer war (Abb. 29A, C').

Zusammenfassend lassen die hier aufgeführten Versuche darauf schließen, dass die Induktion tektaler Strukturen durch *Meis2* unabhängig von der positiven Rückkopplungsschleife des MHO erfolgt. Diese Befunde weisen darauf hin, dass dieser Funktion ein anderer Mechanismus zugrunde liegt.

3.4 Identifizierung von Meis2-Interaktionspartnern im anterioren Neuralrohr

Meis-Proteine sind Ko-Transkriptionsfaktoren, d.h. sie bilden Komplexe mit anderen Regulatoren der Genexpression und steuern so die Aktivität nachgeschalteter Gene. Es konnten bereits einige Interaktionspartner von Meis-Proteinen im posterioren Neuralrohr und in nicht-neuralen Geweben identifiziert werden. Allerdings ist es bisher noch unklar, mit welchen Proteinen Meis2 im anterioren Neuralrohr, also im Vorderhirn, in den Anlagen der Retina und im Mittelhirn, interagiert. Meis2 übt wichtige Funktionen in der Entwicklung dieser Gewebe aus. Um Aufschluss über die Funktionsweise von Meis2 zu erlangen, ist es daher unerlässlich, die Interaktionspartner von Meis2 auch in diesen Geweben zu identifizieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche biochemische Arbeitstechniken angewandt.

3.4.1 Meis2 bildet in der tektalen Anlage des Hühnchens Komplexe mit Otx2

Wie die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel gezeigt haben, übt Meis2 bei der Entwicklung des optischen Tektums eine Art Schlüsselfunktion aus. Meis2 legt tektales Zellschicksal fest und kann die Entwicklung tektumspezifischer Strukturen induzieren. Dabei ist Meis2, im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Regulatoren der Tektumentwicklung, nicht Teil der positiven Rückkopplungsschleife des MHO, welche bislang als unumgänglich für die Tektumentwicklung beschrieben wurde (Wurst und Bally-Cuif, 2001; Martinez, 2001; Nakamura et al., 2005). Daher stellte sich zunächst die Frage, welcher Mechanismus der Induktion eines tektalen Zellschicksals durch Meis2 zugrunde liegt.

Wie die in Kapitel 3.3 dargestellten Ergebnisse von Fehlexpressionsstudien mit Meis2 zeigten, ist die Tektum-induzierende Funktion von Meis2 auf die Alarplatte des Neuralrohrs anterior der Mittel-Hinterhirn Grenze beschränkt. Das anteriore Neuralrohr wird durch die Expression des Transkriptionsfaktors Otx2 gekennzeichnet und festgelegt. Somit ist die Funktion von Meis2 auf den Bereich beschränkt, in dem auch Otx2 exprimiert wird. Otx2 ist, wie in der Einleitung beschrieben, auch für die weitere Spezifizierung von anterioren Hirnstrukturen, also für das Vorderhirn, dem Zwischenhirn und dem Mittelhirn, von Bedeutung. Daher bestand also die Möglichkeit, dass die Entwicklung tektaler Strukturen über eine Kooperation von Meis2 mit Otx2 erfolgt. Diese Hypothese wurde im Folgenden mit Hilfe unterschiedlicher biochemischer Methoden untersucht.

Die Immundetektion von Otx2 auf einem „Western-Blot“ nach Auftrennung von Gewebelysaten der tektalen Anlage in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Zellfraktion, sollte zunächst die zelluläre Lokalisation des Proteins überprüfen. Hier zeigte sich eine ausschließlich nukleäre Lokalisation von Otx2 im Mittelhirn des Hühnchens in den Stadien HH 14 - 16. Dies war deutlich an einer starken Bande bei 38 kDa in der nukleären Fraktion zu sehen (Abb. 30, Nukl). Zusätzlich war auch immer eine zweite, vergleichsweise schwächere Bande bei ca. 42 kDa zu erkennen. Abbildung 30 (unten) zeigt die Immundetektion von Meis2 auf derselben PVDF-Membran. Hier war eine Bande bei ca. 48 kDa zu erkennen, die ebenfalls hauptsächlich in der nukleären Fraktion vorlag. Somit liegen in den untersuchten Entwicklungsstadien beide Proteine im Nukleus der Zellen vor.

Um eine mögliche Komplexbildung von Meis2 und Otx2 im Mittelhirn des Hühnchens zu überprüfen, wurden im Anschluss Ko-Immunoprecipitationen durchgeführt. Dazu wurden beide Zellfraktionen vereinigt und ein Teil des eingesetzten Lysates vor dem Versuch abgenommen (Abb. 30, In.). Um auszuschließen, dass Otx2 mit den eingesetzten ProteinG-Agarose-Kügelchen unspezifisch reagiert oder dass der für die Immundetektion eingesetzte Otx2-Antikörper mit Bestandteilen der aufgetragenen Kügelchen unspezifisch reagiert, wurde das Gewebelysat zunächst alleine mit der ProteinG-Agarose inkubiert. Hier waren keinerlei unspezifische Reaktionen zu erkennen (Abb. 30, ohne AK). Als Kontrolle für unspezifische Reaktionen von Otx2-Proteinen mit konservierten Regionen der Antikörpermoleküle wurde ein Antikörper gegen GFP verwendet (Abb. 30B, α -Kontroll-IgG).

Bei Verwendung des Meis2-Antikörpers konnte eine massive Präzipitation von Otx2-Proteinen beobachtet werden (Abb. 30A, IP), während sich nach einer Ko-IP mit dem Kontroll-Antikörper kein Otx2 im Präzipitat nachweisen ließ (Abb. 30B, IP). Ein Vergleich der Bandenstärken der Banden bei 38 kDa, zeigte eine starke Konzentrierung von Otx2 im Präzipitat gegenüber der eingesetzten Menge an Otx2 im Versuch mit dem Meis2-Antikörper (Abb. 30A, In, IP). Bemerkenswert ist, dass die bereits im Lysat erkennbare, schwache zweite Bande bei ca. 42 kDa ebenfalls mit dem Meis2-Antikörper präzipitierte. In der Kontrolle hingegen war auch diese Bande nicht zu finden.

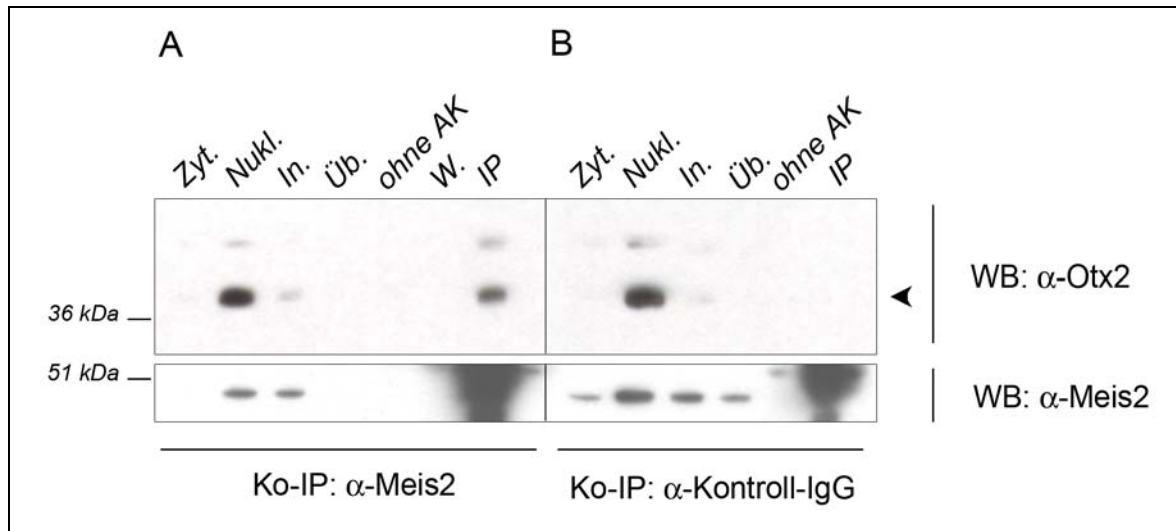


Abbildung 30: Meis2 bildet *in vivo* Komplexe mit Otx2 in der tektalen Anlage des Hühnchens. Nachweis von Otx2 auf einem „Western-Blot“ nach Ko-Immunopräzipitation aus nativen Lysaten von HH 14 – 16 Hühnchen-Mittelhirnen mit einem Meis2-Antikörper (A) und einem nicht relevanten Antikörper als Kontrolle (B). Unten: Immundetektion von Meis2 auf derselben Membran. Zyt: zytoplasmatische Zellfraktion; Nukl.: nukleäre Zellfraktion; In: „Input“, eingesetztes Zelllysate nach Vereinigung der zytoplasmatischen und nukleären Zellfraktionen; Üb: Überstand; ohne AK: Zelllysate nach Inkubation mit ProteinG-Agarose-Kügelchen ohne Antikörper. W.: letzter Waschschrift; IP: Eluat der Immunopräzipitation. Otx2 präzipitiert mit dem Meis2-Antikörper, nicht aber mit dem Kontroll-Antikörper oder mit den Kügelchen alleine.

Die Immundetektion von Meis2 auf derselben Membran als zusätzliche Kontrolle zeigte einen kompletten Verlust von Meis2-Proteinen in der Überstandskontrolle des Experimentes. Dies bestätigt die Bindung der endogenen Meis2-Proteine an den eingesetzten Meis2-Antikörper (Abb. 30A, unten, Üb). Im Kontrollexperiment mit dem GFP-Antikörper hingegen, war ungefähr die gleiche Menge an Meis2 im Überstand wie vor Zugabe des Antikörpers zu sehen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Meis2 nicht vom GFP-Antikörper gebunden wurde (Abb. 30B, Ü). Der Nachweis von Meis2 zeigte im Präzipitat beider Versuche eine massive Färbung (Abb. 30, unten, IP). Die in der IP eingesetzten Antikörper werden ebenfalls präzipitiert. Daher ist im Experiment mit dem Meis2-spezifischen Antikörper die Immundetektion von Meis2 nicht zum Nachweis von endogenem Meis2 geeignet. Hier wurde für die Ko-IP sowie für die Immundetektion der gleiche Antikörper verwandt. Daher wird die Meis2-spezifische Bande vermutlich durch den in der Ko-IP eingesetzten Antikörper überdeckt. Im Kontrollexperiment war ebenfalls eine deutliche Färbung zu sehen, die jedoch auch auf den im Eluat der Ko-IP befindlichen GFP-Antikörper zurückzuführen ist. Der GFP-Antikörper wurde, wie auch der Meis2-Antikörper, im Kaninchen hergestellt und wurde daher bei der Immundetektion vom Zweitantikörper erkannt, welcher gegen das FC-Fragment des Kaninchens gerichtet ist.

Die starken Färbungen in den Eluaten der Ko-IPs, bestätigen somit ein massives Vorhandensein der entsprechenden Antikörper in den entsprechenden Experimenten.

Diese Ko-Immunopräzipitations-Experimente zeigten, dass Meis2 in der tektalen Anlage von HH 14 – 16 Hühnchen *in vivo* in Komplexen mit Otx2 vorliegt.

3.4.2 Die Meis2/Otx2-Interaktion ist DNA-unabhängig und wird über mehrere Peptidsequenzen des Meis2-Proteins vermittelt

Im Entwicklungsstadium HH 14 – 16 existieren also im Mittelhirn des Hühnchens Meis2/Otx2-Komplexe, was die Vermutung nahe legt, dass Meis2 tektales Schicksal über eine Interaktion mit Otx2 festlegen könnte. Um diese Interaktion genauer zu untersuchen, wurde die Methode des GST-„Pull-Downs“ angewandt. Dafür wurden verschiedene, bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine über Glutathion-Sepharose-Kügelchen aufgereinigt und anschließend mit Lysaten aus HH 14 – 18 Mittelhirnen von Hühnchenembryos inkubiert, gewaschen und mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Immundetektion von Otx2 zeigte im Präzipitat des „Pull-Downs“ eine starke Bande bei 38 kDa nach Einsatz von Meis2-GST (Abb. 31A, PD links). Wurde im „Pull-Down“(PD)-Experiment das GST-Protein alleine eingesetzt, so war kein Otx2 im Präzipitat nachzuweisen (Abb. 31, PD rechts). Somit kann eine unspezifische Bindung von Otx2 an den GST-Anteil von Meis2-GST ausgeschlossen werden. Überdies wurde auch eine unspezifische Bindung von Otx2 an die Glutathion-Sepharose-Kügelchen überprüft, indem das Lysat vor dem Experiment mit Kügelchen ohne daran gebundenes GST-Fusionsprotein inkubiert wurde. Auch in diesem Fall war im Präzipitat kein Otx2 nachzuweisen, so dass auch diese Möglichkeit ausgeschlossen werden konnte (Abb. 31A, SK). Somit ist also davon auszugehen, dass Otx2 in Lysaten der tektalen Anlage spezifisch mit dem Meis2-Anteil des GST-Fusionsproteins interagiert. Bemerkenswerterweise war in den Gewebelysaten, sowie auch in den Präzipitaten, stets eine zweite Bande bei ca. 42 kDa vorhanden.

Weitere PD-Experimente zeigten, dass eine starke Interaktion von Otx2 mit dem Meis2-GST-Protein auch nach einer Behandlung des Gewebelysates mit dem Enzym DNaseI vorhanden war (Abb. 31B). Die Interaktion von Otx2 und Meis2 ist demnach auch in Abwesenheit von DNA möglich und scheint somit DNA-unabhängig zu sein.

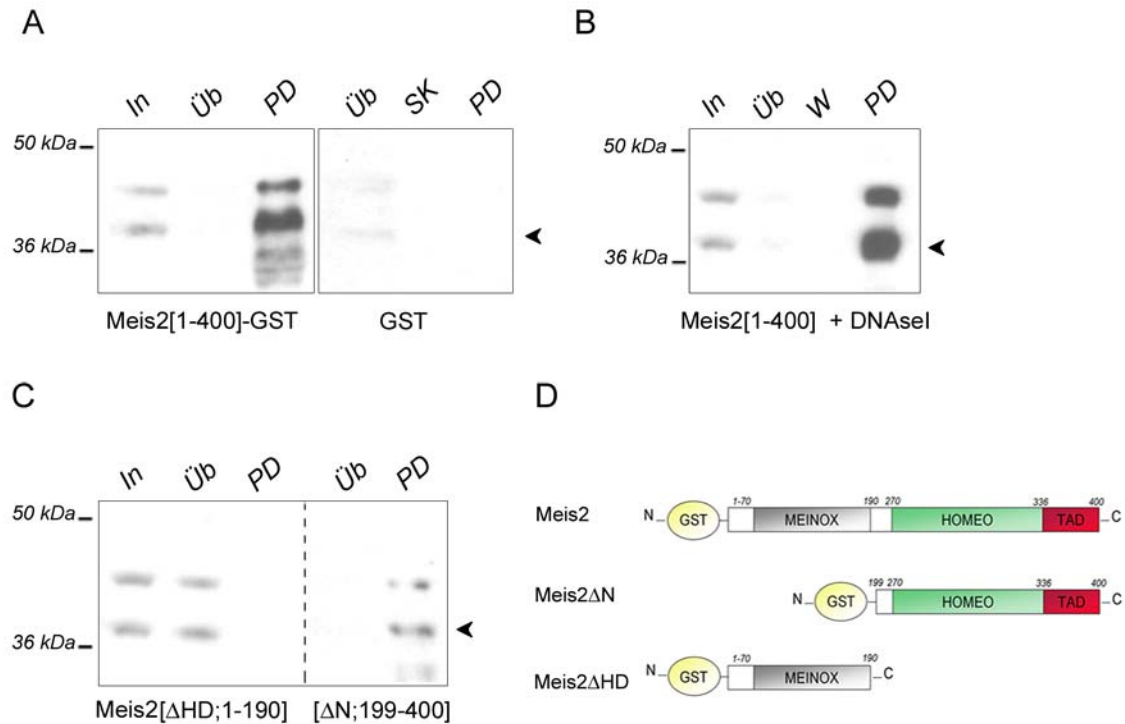


Abbildung 31: Die Interaktion von Meis2 und Otx2 ist DNA-unabhängig und wird über mehrere Peptidsequenzen von Meis2 vermittelt. (A – C) Immundetektion von Otx2 auf „Western-Blots“ nach GST-„Pull-Down“-Experimenten aus tektalen Gewebelysaten unter Verwendung des Meis2-GST-Volllängens-fusionsproteins und des GST-Proteins alleine als Kontrolle (A), nach DNaseI Behandlung des Lysates (B) und unter Verwendung der beiden Meis2-GST-Deletionskonstrukte Meis2ΔHD und Meis2ΔN (C). (D) Schematische Darstellung der hier verwendeten Meis2-GST-Fusionskonstrukte. In: *Input*, eingesetzte Menge; Üb: Überstand; PD: Präzipitat des „Pull-Downs“; SK: Sepharose-Kügelchen ohne gebundenem GST-Protein nach Inkubation mit dem Lysat. W: letzter Waschschrift.

Um zu untersuchen, welcher Anteil des Meis2-Proteins die Interaktion mit Otx2 vermittelt, wurden zwei Deletionskonstrukte von Meis2 eingesetzt, welche ebenfalls an GST fusioniert wurden (Abb. 31D, Meis2ΔHD, Meis2ΔN). Nach PD-Experimenten mit dem Meis2ΔHD-Konstrukt war im Präzipitat kein Otx2 nachzuweisen (Abb. 31C; ΔHD, PD). Somit findet eine Interaktion von Otx2 mit Meis2 in Abwesenheit der Homeodomäne von Meis2 nicht mehr statt. Folglich ist die Homeodomäne von Meis2 essentiell für die Interaktion mit Otx2. Bei Verwendung des Meis2ΔN-Konstrukts wurde Otx2 hingegen präzipitiert (Abb. 31C, ΔN, PD). Die Intensität der Otx2-spezifischen Bande im Pellet der Experimente mit dem Meis2ΔN-GST Konstrukt war jedoch vergleichsweise geringer als in Präzipitaten mit dem Volllängenskonstrukt Meis2-GST, obwohl ähnliche Ausgangsmengen von Otx2 eingesetzt wurden (vergleiche Abb. 31A, In und 31C, In). Somit scheint die Interaktion von Otx2 mit dem Meis2ΔN-GST Konstrukt schwächer zu sein. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass für die Interaktion mit Otx2 die gesamte Polypeptidsequenz

von Meis2 benötigt wird oder dass zumindest mehrere, unterschiedliche Domänen innerhalb des Meis2-Proteins für eine stabile Interaktion mit Otx2 benötigt werden.

3.4.3 Charakterisierung der Interaktionsdomäne von Otx2

Um zu untersuchen, welche Sequenzen des Otx2-Proteins die Interaktion mit Meis2 vermitteln, wurden verschiedene Deletionsvarianten von Otx2 hergestellt und ebenfalls mit Hilfe von GST-Experimenten untersucht. Die verschiedenen Deletionskonstrukte von Otx2 wurden mit Hilfe der *in vitro* Transkriptions-/Translations-Methode (*TnT[®] T7/T3 coupled Reticulocyte Lysate System*, Promega) hergestellt und dabei zum Nachweis der Proteine mit [³⁵S]-Methionin radioaktiv markiert.

Wie in Abbildung 32 dargestellt, konnte mit Meis2-GST auch *in vitro* eine starke Präzipitation des Volllängen-Otx2-Proteins festgestellt werden (Abb. 32 A (1)). Da es sich bei dem hier verwendeten System um ein zellfreies System handelt, sind keine anderen tektalen Proteine vorhanden. Die Interaktion von Meis2 mit Otx2 benötigt daher vermutlich keine weiteren tektalen Proteine und muss somit direkt sein. Das Volllängen-Otx2-Protein war auch nach Inkubation des Lysates mit DNaseI nach einem „Pull-Down“ mit Meis2-GST im Präzipitat vorhanden, so dass hier ebenfalls *in vitro* eine DNA-unabhängige Interaktion von Otx2 mit Meis2 bestätigt werden konnte (Abb. 32D).

Mit Hilfe weiterer PD-Experimente konnte festgestellt werden, dass die Deletion der ersten 35 oder der letzten 66 Aminosäuren von Otx2 keine Auswirkungen auf die Interaktion mit Meis2-GST hatte. Beide Konstrukte präzipitierten mit Meis2-GST (Abb. 32A, (2), (6)). Bei Verwendung eines Otx2-Proteins mit einer Deletion der ersten 101 Aminosäuren fand hingegen eine Interaktion mit Meis2-GST nicht mehr statt (Abb. 32A, (5)). Die Kontrollversuche mit GST alleine zeigten keine Interaktion mit den jeweiligen Deletionsvarianten, so dass die Interaktion spezifisch auf den Meis2-Anteil von Meis2-GST zurückzuführen ist (Abb. 32A, unten). Da eine Deletion der N-terminalen 101 As, nicht aber die Deletion der ersten 35 As die Homeodomäne einschließt, zeigten diese Versuche zunächst, dass die Homeodomäne von Otx2 an der Interaktion mit Meis2 beteiligt ist (Abb. 32C).

Weiterführende Versuche unter Verwendung verschiedener Deletionsvarianten in der Homeodomäne von Otx2 zeigten, dass die Interaktion zwar nicht durch eine Deletion der ersten 35 Aminosäuren, jedoch durch eine Deletion der ersten 53 Aminosäuren des Otx2-Proteins beeinträchtigt wurde (Abb. 32B, (3)). Das Fehlen der ersten 53 Aminosäuren im Otx2-Protein führte zu einem Verlust der Fähigkeit zur Interaktion mit Meis2-GST.

Folglich konnte auch mit einer Deletionsvariante, bei welcher die ersten 70 Aminosäuren von Otx2 fehlen, keine Interaktion mit Meis2-GST festgestellt werden (Abb. 32B, (4)). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Interaktion von Meis2 und Otx2 innerhalb einer 18 Aminosäure-langen Sequenz, der Aminosäuren 36 – 53, von Otx2 vermittelt wird. Diese Sequenz schließt einige Aminosäuren N-terminal der Homeodomäne und die erste Hälfte der α -1 Helix der Homeodomäne von Otx2 ein (Danno et al., 2008).

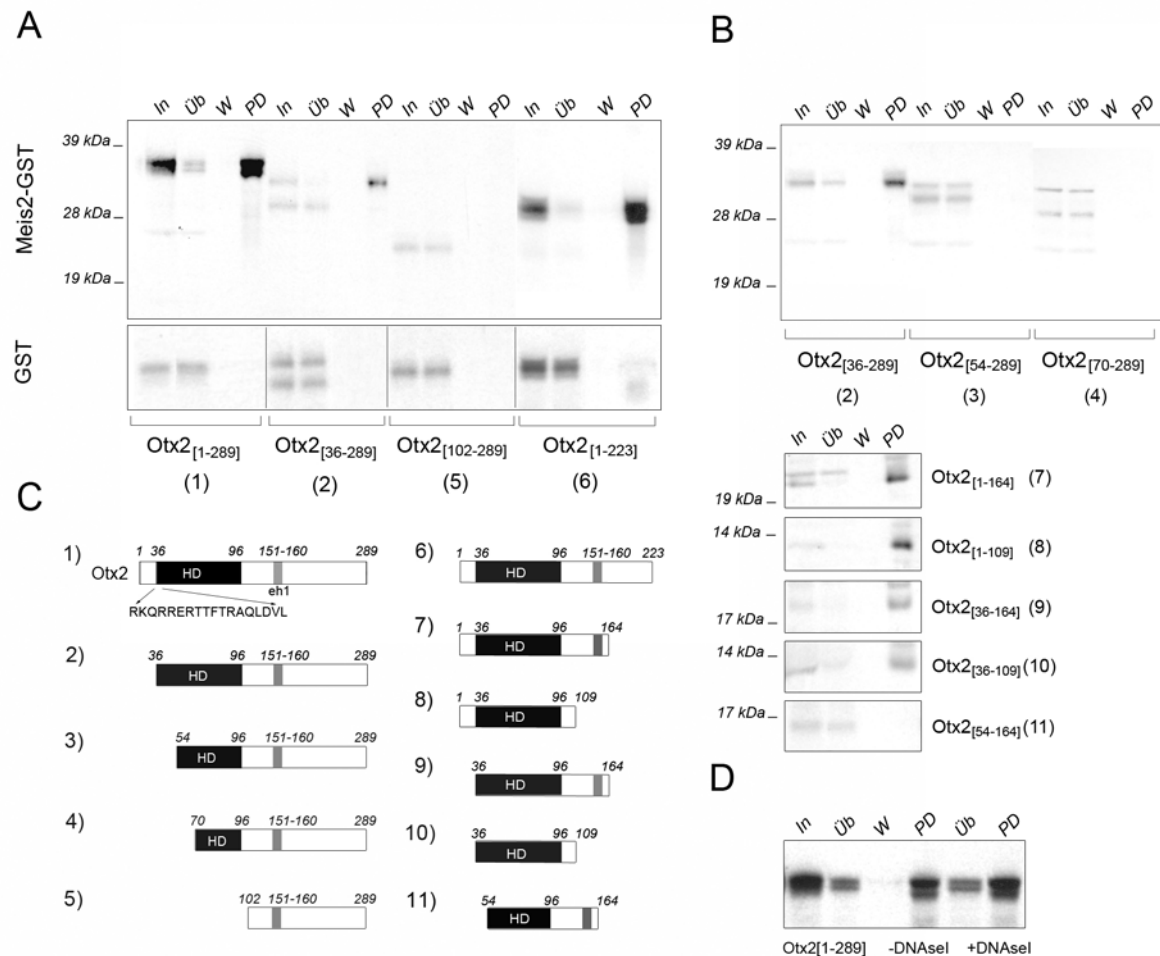


Abbildung 32: Die Interaktion von Otx2 und Meis2 ist direkt und wird über 18 As am N-terminus der Homeodomäne von Otx2 vermittelt. (A, B, D) GST-„Pull-Down“ Experimente mit *in vitro* translatierten radioaktiv markierten Deletionsvarianten des Otx2-Proteins. (A) Das Otx2-Volllängenkonstrukt, die N-terminale Deletion von As 1-35 (Otx2₃₆₋₂₈₉) und die C-terminale Deletion von As 223-289 (Otx2₁₋₂₂₃) interagieren mit Meis2-GST nicht aber mit GST alleine. Keine Interaktion mit Meis2-GST durch eine Deletion der ersten 101 As (Otx2₁₀₂₋₂₈₉). (B) Während die Deletion der ersten 35 As die Interaktion nicht beeinträchtigt, ist durch eine Deletion der ersten 53 As keine Interaktion mehr mit Meis2-GST möglich. Das Fehlen einer 18 As langen Sequenz am N-terminus der Homeodomäne, nicht aber das Fehlen des Eh1-Motifs führt zum Verlust einer Interaktion von Otx2 und Meis2-GST. (C) Schematische Darstellung der verwendeten Deletionskonstrukte von Otx2. (D) DNaseI-Behandlung des Lysats zeigt, dass die Interaktion von Meis2 und Otx2 DNA-unabhängig ist. In: Input; eingesetzt Menge; Üb: Überstand; W: letzter Waschschritt; PD: Präzipitat des „Pull-Downs“.

Es wurden bereits mehrere Interaktionspartner von Otx2 identifiziert. Im Mittelhirn beispielsweise interagiert Otx2 mit Grg4/Tle4 (*groucho-related protein 4/ transducin-like enhancer of split 4*), einem Ko-Repressorprotein (Puelles et al., 2004; Heimbucher et al., 2007). Wie diese Untersuchungen zeigten, wird die Interaktion mit Grg4/Tle4 über das so genannte Eh1-Motiv von Otx2 vermittelt. Das Eh1-Motiv ist im Otx2-Protein C-terminal der Homeodomäne lokalisiert. Es ist ein aus etwa 10 Aminosäuren bestehendes, hoch konserviertes Motiv, welches auch in anderen mit Grg4/Tle4-interagierenden Proteinen zu finden ist (Heimbucher et al., 2007).

GST-„Pull-Down“ Experimente mit Deletionskonstrukten, bei welchen unterschiedliche Abschnitte des C-Terminus, einschließlich des Eh1-Motivs von Otx2, deletiert waren, zeigten in jedem Fall, dass eine Interaktion von Otx2 und Meis2 auch in Abwesenheit dieses Motivs stattfinden kann (Abb. 32B unten, (8) und (10)). Hier konnte jedoch erneut bestätigt werden, dass die Interaktion nicht mehr bei Deletion der Aminosäuren 36 – 55 stattfinden kann (Abb. 32B unten (11)). Eine Deletion der Aminosäuren 36 – 109 hingegen besaß weiterhin die Fähigkeit mit Meis2-GST zu interagieren (Abb. 32B unten (10)). Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass das Eh1-Motiv für die Interaktion von Otx2 mit Meis2 nicht benötigt wird.

3.4.4 Analysen zur funktionellen Relevanz der Otx2/Meis2-Interaktion

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Versuche zeigten, dass Meis2 in der tektalen Anlage des Hühnchens in Komplexen mit Otx2 vorliegt. Dieser Befund lässt vermuten, dass der Mechanismus, über welchen Meis2 tektale Entwicklung festlegt und reguliert, eine Interaktion von Meis2 mit Otx2 beinhaltet. Um die funktionelle Relevanz dieser Interaktion zu untersuchen, wurden im Folgenden verschiedene Fehlexpressionsstudien durchgeführt.

Es ist bekannt, dass die Fehlexpression von Otx2 im Metenzephalon, dem Bereich des Neuralrohrs, aus dem im Verlauf der normalen Entwicklung das Zerebellum (Kleinhirn) entsteht, zur Induktion und Entwicklung ektopischer Tekta führt (Katahira et al., 2000). Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Nach der Fehlexpression von Otx2 im Metenzephalon waren anstelle des Zerebellums zwei ektopische Strukturen zu sehen (Abb. 33C, C', F; n = 4). Zum Vergleich ist in Abbildung 33E ein wildtypisches Gehirn dargestellt. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos konnte zudem festgestellt werden, dass die Fehlexpression von Otx2 im Metenzephalon zur

Induktion von *Meis2* führte. Dies war bereits 24 h und auch 48 h nach Elektroporation zu sehen (Abb. 33A, B; n = 4). Also geht die *Otx2*-vermittelte Induktion tektaler Strukturen mit einer Induktion von *Meis2*-Expression einher.

Um zu untersuchen, ob die *Meis2*-Funktion für die *Otx2*-vermittelte Induktion ektopischer Tekta benötigt wird, wurde *Otx2* zusammen mit *Meis2EnR* im Metenzephalon fehlexprimiert. In Abbildung 33 sind frei präparierte Gehirne 6 bzw. 9,5 Tage nach Ko-Elektroporation der beiden Konstrukte dargestellt (Abb. 33D, D', G; n = 4). Es kam hierbei zwar ebenfalls zur Induktion und Entwicklung eines ektopischen Tektums, was anhand der ektopischen Strukturen und das Fehlen eines Zerebellums zu erkennen war. Im Gegensatz zu den ektopischen Strukturen, die nach Fehlexpression von *Otx2* alleine zu sehen waren, schien die ektopische Struktur nach Ko-Elektroporation mit *Meis2EnR* jedoch kleiner. Hierbei war auffällig, dass die Fehlexpression von *Otx2* alleine zur Entwicklung zweier paarig angelegter ektopischer Tekta im Metenzephalon führte (Abb. 33C, C', F). Die Ko-Elektroporation von *Meis2EnR* führte hingegen nur in einem der beiden ektopischen Tekta zu einer Entwicklungsstörung. Die *Meis2EnR*-bedingte Veränderung erfolgte hier stets nur im rechten ektopischen Tektum, also auf der elektroporierten Seite des Gehirns (Abb. 33D, D', F).

Diese Untersuchungen zeigten also, dass die Funktionsunterdrückung von *Meis2* eine durch *Otx2* bedingte Induktion tektaler Strukturen hemmen bzw. stören kann. Dieses Ergebnis untermauert somit die bisher beschriebenen Befunde, dass *Meis2* für die Entwicklung tektaler Strukturen benötigt wird.

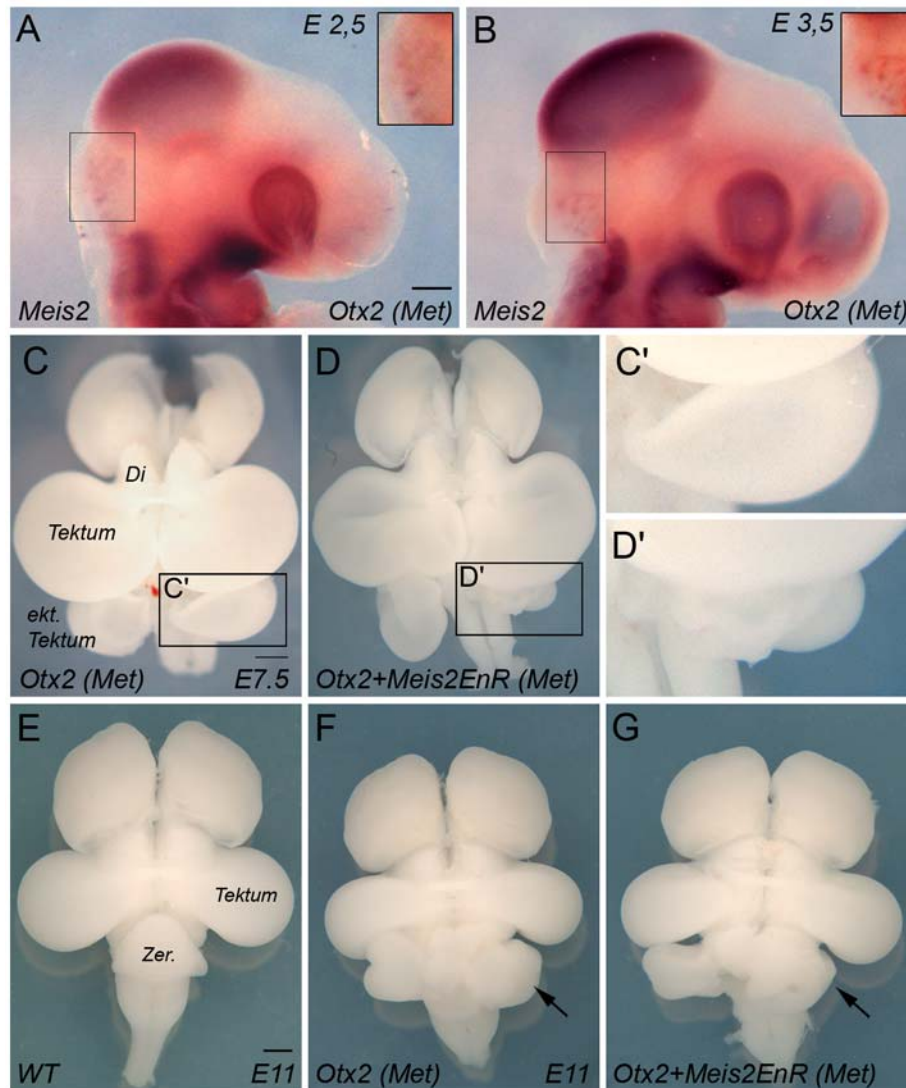


Abbildung 33: *Meis2EnR* stört die *Otx2*-vermittelte Entwicklung eines ektopischen Tektums im Metenzephalon. (A, B) *In situ* Hybridisierung mit einer *Meis2*-Sonde 24 h (A) und 48 h (B) nach Fehlexpression von *Otx2* im Metenzephalon. Fehlexpression von *Otx2* im Metenzephalon induziert innerhalb von 24 h *Meis2*-Expression. (C – G) Vom umgebenden mesenchymalen Gewebe isolierte Gehirne im Alter von E 7,5 (C – D') und E 11 (E – G) nach Fehlexpression von *Otx2* alleine (C, F) oder *Otx2* zusammen mit *Meis2EnR* im Metenzephalon (D, G). (C', D') Vergrößerte Ausschnitte der entsprechenden, in C und D gekennzeichneten Bereiche. (E) Wildtypisches Hirn bei E 11. Die Pfeile in F und G zeigen die ektopischen Strukturen auf der elektroporierten Seite des Gehirns. Di: Diencephalon; ekt.: ektopisch; Zer: Zerebellum. Maßstab: A, B : 200 µm; C, D und E – G : 1 mm.

Um der Frage nachzugehen, ob die Induktion tektaler Strukturen eine Interaktion von *Meis2* mit *Otx2* erfordert, wurde die *Otx2*-Deletionsvariante *Otx2Δ1-53* im Metenzephalon fehlexprimiert. Wie die biochemischen Versuche gezeigt hatten, führte die Deletion der ersten 53 Aminosäuren von *Otx2* zum Verlust der Interaktionsfähigkeit mit *Meis2*. Zehn Tage nach Fehlexpression von *Otx2Δ1-53* im Metenzephalon waren keine ektopischen

Tekta zu sehen, sondern es war deutlich wie im wildtypischen Gehirn das Zerebellum zu erkennen (vergleiche Abb. 34C, D, $n = 14$). Somit führte die Fehlexpression dieses Deletionskonstruktes nicht zur Induktion und Entwicklung tektaler Strukturen im Metenzephalon. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Otx2-vermittelte Induktion tektaler Strukturen eine Interaktion von Otx2 mit Meis2 benötigt. Allerdings konnte in diesem Fall auch keine Induktion von *Meis2* beobachtet werden, wie *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos 24 h bzw. 48 h nach Fehlexpression von *Otx2Δ1-53* deutlich machten (Abb. 34A und B; $n = 11$).

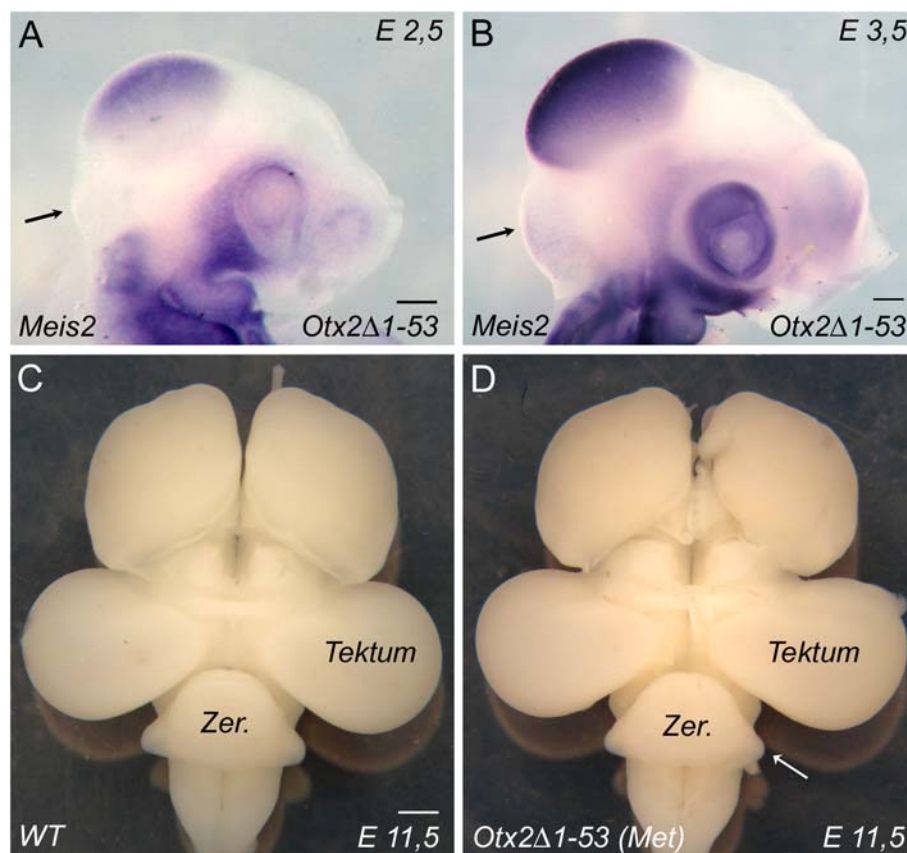


Abbildung 34: Die Fehlexpression von *Otx2Δ1-53* im Metenzephalon führt weder zur Induktion ektopischer Tekta noch zur Induktion von *Meis2*. (A, B) *In situ* Hybridisierung zum Nachweis von *Meis2*-Transkripten 24 h (A) und 48 h (B) nach Fehlexpression von *Otx2Δ1-53* im Metenzephalon. (C, D) Vom umgebenden mesenchymalen Gewebe isoliertes Gehirn eines wildtypischen Embryos (C) und eines Embryos 10 Tage nach Fehlexpression von *Otx2Δ1-53* im Metenzephalon (D). E: Embryonaler Tag; WT: Wildtyp; Zer: Zerebellum. Maßstab: A, B: 200 μ m; C, D: 1 mm.

Die zuletzt beschriebenen Befunde geben einen ersten Hinweis auf eine funktionelle Relevanz der Meis2/Otx2-Interaktion. Sie erklären aber noch nicht ob, und wenn ja, welchen Einfluss Meis2 auf die Funktion von Otx2 hat. Um in diesem Zusammenhang einen tieferen Einblick in die Funktionsweise von Meis2 zu erlangen, wurde die transkriptionelle Aktivität von Otx2 in Anwesenheit von Meis2 untersucht. Hierzu wurde ein Gal4-abhängiges Reportersystem verwendet. Durch die Fusion an die Gal4-DNA-Bindedomäne kann Otx2-Gal4 spezifisch die Expression des *Firefly*-Luziferase-Reporterkonstruktes regulieren.

Wie mit Hilfe von Luziferase-Reporter- und RNA-Protektions-Experimenten gezeigt wurde, kann Otx2 als transkriptioneller Aktivator wirken (Puelles et al., 2004; Heimbucher et al., 2007). Arbeiten unseres Labors konnten zeigen, dass ein Meis2-Gal4 Fusionsprotein im Kontext eines Gal4-getriebenen Luziferase-Systems, ebenfalls als transkriptioneller Aktivator wirkt (D. Schulte, unveröffentlicht). Es bestand also die Möglichkeit, dass die Interaktion von Meis2 mit Otx2 das Aktivierungspotential von Otx2 verstärkt und so die Transkription bestimmter Gene im Mittelhirn fördert.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Gal4-Reporterkonstrukt mit *Otx2-Gal4* alleine oder zusammen mit *Meis2HA* in Mausfibroblasten der Zelllinie NIH3T3 exprimiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der lediglich das Reporterkonstrukt ohne Zugabe weiterer Faktoren enthielt. In Diagramm 1 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Die Transfektion von *Meis2HA* alleine veränderte nicht die Luziferaseaktivität gegenüber der Kontrolle. Somit hat *Meis2HA* alleine keine Auswirkungen auf die Aktivität des Reporterkonstruktes (Diagramm 1, Säule 2). Wurden die Zellen mit *Otx2-Gal4* alleine transfiziert, so kam es zur Aktivierung des Reporterkonstruktes (Diagramm 1, Säule 3). Dies bestätigt vorangegangene Untersuchungen (Heimbucher et al., 2007). Die Ko-Transfektion von *Meis2HA* zusammen mit *Otx2-Gal4* führte jedoch nicht zu einer Veränderung der relativen Luziferaseaktivität im Vergleich zur Aktivität mit Otx2-Gal4 alleine. Die Aktivität war hier im Mittel mit der Aktivität nach Transfektion des *Otx2-Gal4*-Konstruktes alleine vergleichbar (Diagramm 1, Säule 4). Dies lässt darauf schließen, dass die Meis2-Funktion, zumindest *in vitro*, nicht der Verstärkung der transkriptionellen Aktivierung durch Otx2 dient.

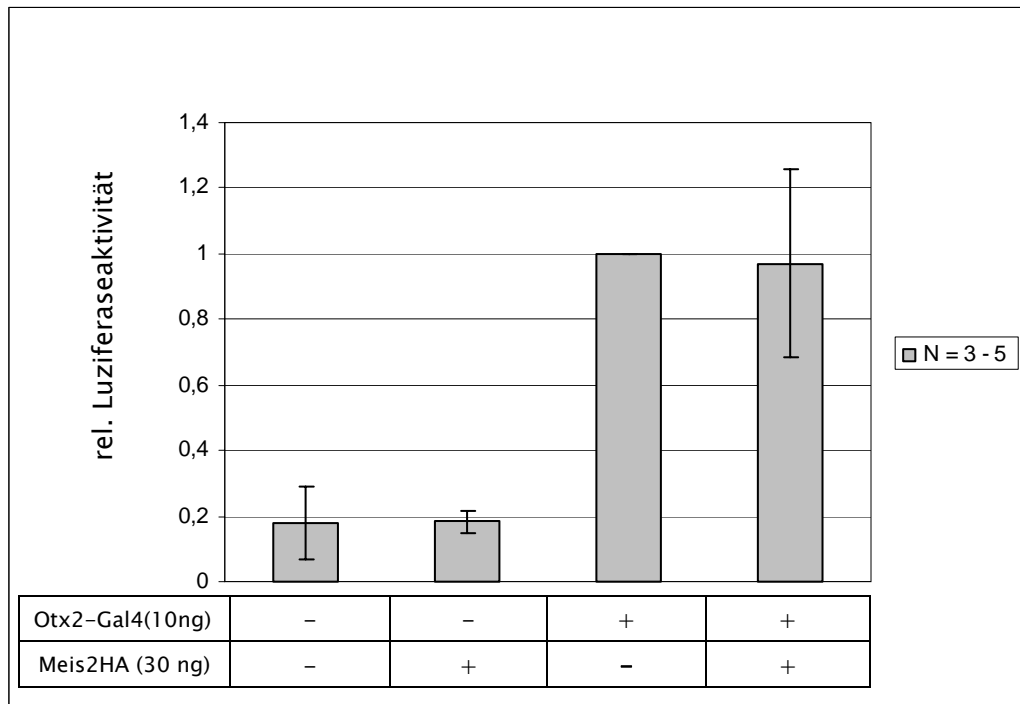


Diagramm 1: Meis2 erhöht nicht die Transaktivierungsaktivität von Otx2. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von jeweils 3 – 5 unabhängigen Transfektionen mit den jeweiligen Standardabweichungen. Hierbei wurden die normierten Werte der Luziferaseaktivität nach Transfektion mit *Otx2-Gal4* alleine auf 1 gesetzt. Die normierten Werte der anderen Versuchsansätze wurden jeweils dazu in Relation gesetzt. Die Transfektion von *Meis2HA* alleine veränderte nicht die rel. Luziferaseaktivität verglichen zum Kontrollansatz (n = 3). Die Transfektion von *Otx2-Gal4* führte zu einer Steigerung der Luziferaseaktivität (n = 5). Die Ko-Transfektion von *Meis2HA* mit *Otx2-Gal4* veränderte im Mittel nicht die rel. Luziferaseaktivität verglichen zur Aktivität mit *Otx2-Gal4* alleine (n = 5).

Der Transkriptionsfaktor Otx2 kann kontextabhängig entweder als Aktivator oder als Repressor wirken. Studien zeigten eine Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Otx2 durch eine Interaktion mit dem Ko-Repressorprotein Grg4/Tle4 (Puelles et al., 2004; Heimbucher et al., 2007). Grg4/Tle4 wird im Mittelhirn bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung exprimiert, und die Expression wird während der Entwicklung bis hin zu späten Entwicklungsstadien aufrechterhalten (Sugiyama et al., 2000; Sugiyama und Nakamura, 2003). Interessanterweise zeigten Versuche von Sugiyama und Kollegen (2000), dass Grg4/Tle4 tektaler Entwicklung entgegenwirkt. Diese Befunde, zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Rolle von Meis2 in der tektalen Entwicklung, bieten die Möglichkeit, dass Meis2 durch Interaktion mit Otx2 einer Grg4/Tle4-vermittelten Unterdrückung tektaler Entwicklung entgegenwirken könnte. Es könnte also sein, dass die Interaktion von Meis2 mit Otx2 dazu führt, dass eine Grg4/Tle4-vermittelte Unterdrückung des Aktivierungspotentials von Otx2 nicht mehr stattfindet.

Um diese Möglichkeit zu testen, wurden weitere Luziferase-Reporterexperimente durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Diagramm 2 dargestellt. Hierbei wurden ebenfalls die normierten Werte der Luziferaseaktivität nach Transfektion des *Otx2-Gal4*-Konstruktes alleine auf 1 gesetzt. Die normierten Werte der anderen Versuchsansätze wurden jeweils in Relation dazu gesetzt. Wie in Diagramm 2 zu sehen ist, führte die Ko-Transfektion von *Otx2-Gal4* zusammen mit dem *Grg4/Tle4*-Konstrukt im Mittel zu einer Senkung der rel. Luziferaseaktivität auf $0,397 \pm 0,103$ (Diagramm 2, Säule 2). Somit konnte hier, wie zuvor schon beschrieben, eine *Grg4/Tle4*-bedingte Unterdrückung des Aktivierungspotentials von *Otx2* beobachtet werden (Puelles et al., 2004; Heimbucher et al., 2007). Um in diesem Zusammenhang den Einfluss von *Meis2* zu testen, wurden unterschiedliche Konzentrationen des *Meis2HA*-exprimierenden Plasmids mit *Otx2-Gal4* und *Grg4/Tle4* ko-transfiziert.

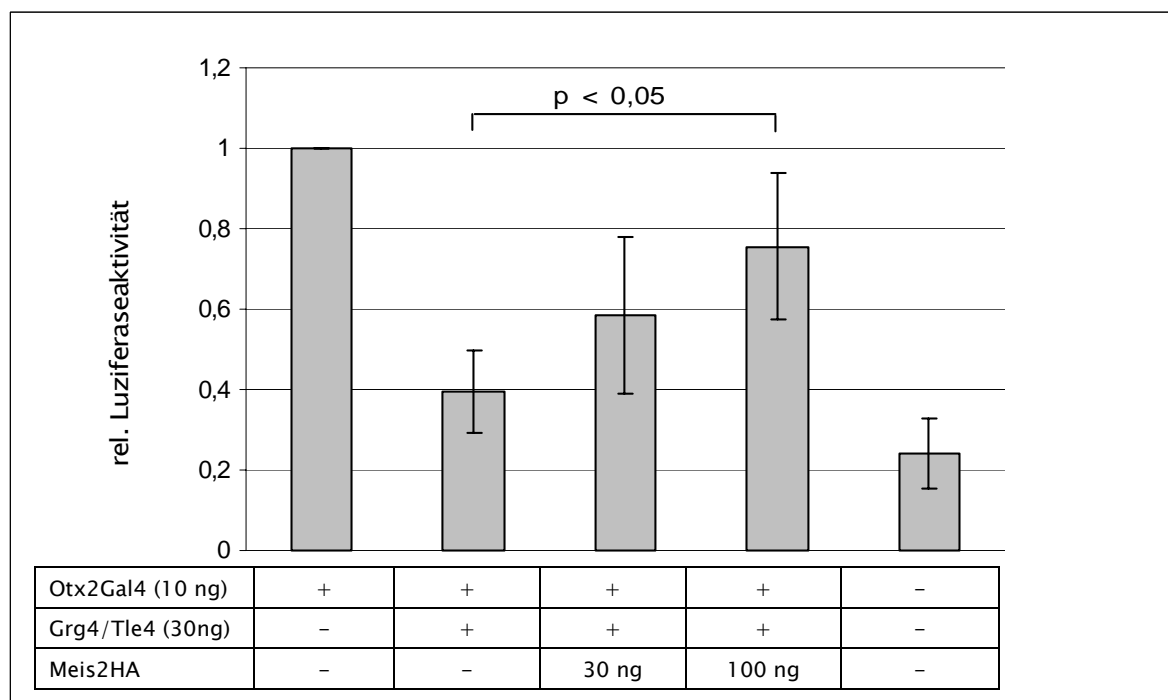


Diagramm 2: Meis2 kann *in vitro* einer Grg4/Tle4-vermittelten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von Otx2 entgegenwirken. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von jeweils 4 – 5 unabhängigen Transfektionen und die jeweiligen Standardabweichungen. Die normierten Werte der Luziferaseaktivität mit *Otx2-Gal4* alleine wurden auf 1 gesetzt (Säule 1). Die normierten Werte der übrigen Versuchsansätze wurden jeweils dazu in Relation gesetzt. Die Zugabe von *Grg4/Tle4* führte zu einer Senkung der rel. Luziferaseaktivität verglichen zu der Aktivität, die mit *Otx2-Gal4* alleine gemessen wurde (Säule 2). Die Ko-Transfektion von 30 ng des *Meis2HA*-Plasmids führte zu einer Erhöhung der rel. Luziferaseaktivität, im Vergleich zur Aktivität die mit *Otx2-Gal4* zusammen mit *Grg4/Tle4* gemessen wurde. Die Steigung war jedoch nicht signifikant (Säule 3, $p > 0,05$). Die Zugabe von 100 ng des *Meis2HA*-Plasmids resultierte hingegen in einer signifikanten Steigerung der rel. Luziferaseaktivität gegenüber des Versuchsansatzes mit *Otx2-Gal4* zusammen mit *Grg4/Tle4* (Säule 4, $p < 0,05$).

Die Transfektion des *Meis2HA*-exprimierenden Plasmids mit der gleichen Menge an *Grg4/Tle4*-Konstrukt zusammen mit *Otx2-Gal4* führte im Mittel zu einem leichten Anstieg der rel. Luziferaseaktivität auf $0,587 \pm 0,195$ im Vergleich zur rel. Luziferaseaktivität nach Transfektion von *Otx2-Gal4* zusammen mit *Grg4/Tle4*. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$; Diagramm 2, Säule 3). Wurden jedoch 100 ng des *Meis2HA*-exprimierenden Plasmids zu 30 ng des *Grg4/Tle4*-exprimierenden Vektors mit *Otx2-Gal4* transfiziert, so kam es zu einem Anstieg der rel. Luziferaseaktivität auf $0,756 \pm 0,183$. Dieser Anstieg wurde, bezogen auf die rel. Luziferaseaktivität in Gegenwart von *Otx2-Gal4* mit *Grg4/Tle4* alleine, als signifikant berechnet ($p < 0,05$; Diagramm 1, Säule 4). Somit führte die Ko-Transfektion von *Meis2HA* zu einer signifikanten Aufhebung der *Grg4/Tle4*-bedingten Unterdrückung des Aktivierungspotentials von *Otx2-Gal4*. Diesen Einfluss scheint *Meis2* jedoch nur dann ausüben zu können, wenn es im Vergleich zum Ko-Repressor *Grg4/Tle4* in größeren Mengen vorhanden ist. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass *Meis2* in der Tat, zumindest *in vitro*, einer *Grg4/Tle4*-vermittelten Unterdrückung der *Otx2*-Aktivität entgegenwirken kann.

Um diese Hypothese zu untermauern wurden weitere Luziferase-Reporterexperimente durchgeführt, in diesem Fall unter Verwendung einer Deletionsvariante des *Otx2-Gal4*-Proteins, *Otx2Δ1-100-Gal4* (Heimbucher et al., 2007). Diesem Konstrukt fehlen die N-terminalen 100 Aminosäuren und somit auch die zuvor in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Interaktionsdomäne zu *Meis2*. Die Transfektion des *Otx2Δ1-100-Gal4*-exprimierenden Plasmids führte zu einer Steigerung der rel. Luziferaseaktivität im Vergleich zum Kontrollexperiment um mehr als das Fünffache. Somit besitzt *Otx2Δ1-100-Gal4* ebenfalls die Fähigkeit das Reporterkonstrukt zu aktivieren (Diagramm 3, Säule 1). Da die Interaktion zu *Grg4/Tle4* über das Eh1-Motiv im *Otx2*-Protein vermittelt wird, die C-terminal der Homeodomäne gelegen ist, interagiert das Deletionskonstrukt ebenfalls mit dem Ko-Repressor *Grg4/Tle4* (Heimbucher et al., 2007). Bei Ko-Transfektion des *Otx2Δ1-100-Gal4*-exprimierenden Plasmids mit dem *Grg4/Tle4*-Konstrukt, wurde eine rel. Luziferaseaktivität von $0,411 \pm 0,246$ gemessen. Die normierte Luziferaseaktivität nach Transfektion von *Otx2Δ1-100* alleine wurde zuvor auf 1 gesetzt. Somit unterdrückt *Grg4/Tle4* auch das Aktivierungspotential der Deletionsvariante *Otx2Δ1-100-Gal4* (Diagramm 3, Säule 2). Um zu testen, ob die zuvor beobachtete *Meis2*-bedingte Aufhebung der *Grg4/Tle4*-vermittelten Unterdrückung auf eine Interaktion von *Meis2* und *Otx2* zurückgeführt werden kann, wurde das *Meis2HA*-exprimierende Plasmid in den zuvor verwend-

ten Konzentrationen mit *Otx2Δ1-100-Gal4* und *Grg4/Tle4* ko-transfiziert. Bei Ko-Transfektion von 30 ng des *Meis2HA*-exprimierenden Plasmids wurde im Mittel eine rel. Luziferaseaktivität von $0,448 \pm 0,194$ gemessen (Diagramm 3, Säule 3). Bei Ko-Transfektion von 100 ng des *Meis2HA*-exprimierenden Plasmids war im Mittel eine rel. Luziferaseaktivität von $0,419 \pm 0,122$ zu messen (Diagramm 3, Säule 4). Es kam also in beiden Fällen nicht zu einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von *Otx2Δ1-100-Gal4* im Vergleich zum *Grg4/Tle4*-vermittelten, unterdrückten Aktivierungspotential. Die Fähigkeit von *Meis2* einer *Grg4/Tle4*-vermittelten Unterdrückung der *Otx2*-Aktivität entgegenzuwirken hängt also von der Anwesenheit der ersten 100 Aminosäuren des *Otx2*-Proteins ab. Dies sind die Aminosäuren, welche auch die Interaktionsdomäne von *Otx2* mit *Meis2* beinhalten. Diese Untersuchungen bestätigten somit die vorangegangenen Experimente, dass eine Interaktion von *Meis2* mit *Otx2* einer *Grg4/Tle4*-vermittelten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von *Otx2* entgegenwirken könnte.

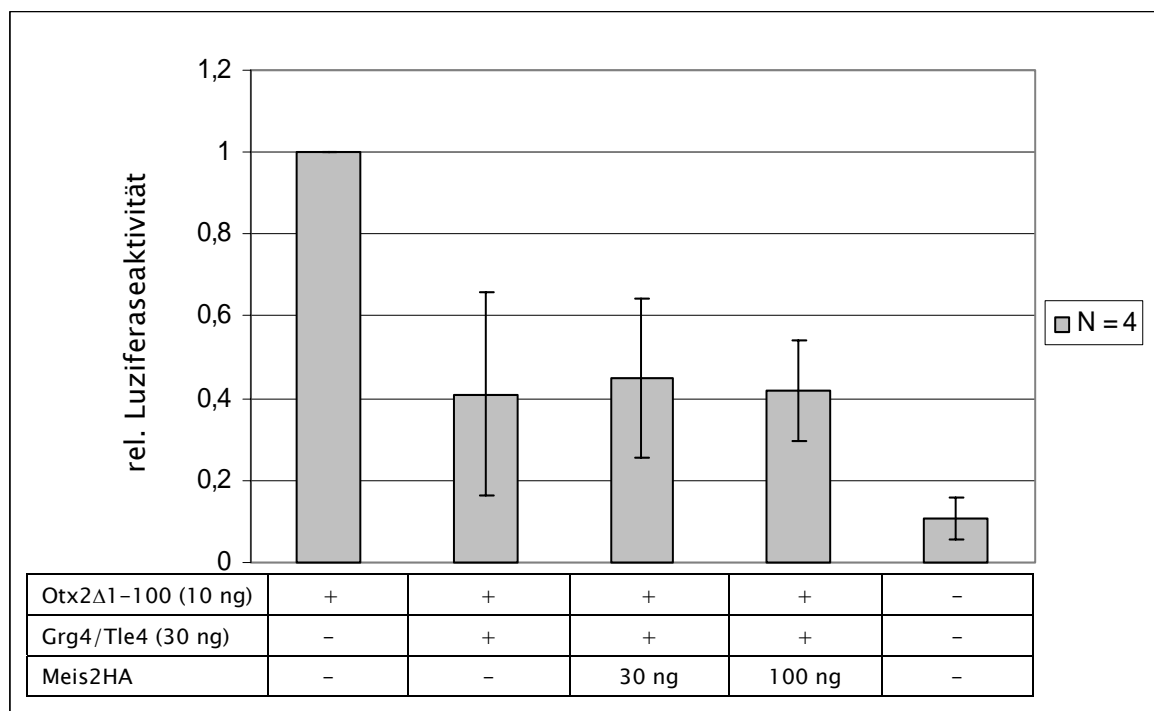


Diagramm 3: *Meis2* kann bei Deletion der ersten 100 As von *Otx2* einer *Grg4/Tle4*-vermittelten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von *Otx2* nicht entgegenwirken Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von jeweils 4 unabhängigen Transfektionen und die jeweiligen Standardabweichungen. Die normierten Werte der Luziferaseaktivität nach Transfektion des *Otx2Δ1-100-Gal4*-Konstruktes alleine wurden auf 1 gesetzt. Die normierten Werte der anderen Versuchansätze wurden in Relation dazu gesetzt. Die Ko-Transfektion von *Grg4/Tle4* führte zu einer Senkung der rel. Luziferaseaktivität, im Vergleich zur rel. Luziferaseaktivität des Deletionskonstruktes alleine (Säule 2). Hier kam es jedoch im Mittel weder durch Ko-Transfektion von 30 ng (Säule 3) noch 100 ng des *Meis2HA*-Plasmids zu einer Veränderung der rel. Luziferaseaktivität im Vergleich zur rel. Luziferaseaktivität, die bei *Otx2Δ1-100-Gal4* zusammen mit *Grg4/Tle4* gemessen wurde (Säule 4).

3.4.5 Meis2 interagiert in der tektalen Anlage des Hühnchens mit Pax3 und Pax7

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, interagiert Meis2 im Mittelhirn des Hühnchens mit Otx2. Es ist vorstellbar, dass Meis2 zur Ausübung seiner Funktionen auch mit anderen Proteinen des Mittelhirns interagiert. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden weitere GST-PD-Experimente und Ko-IP-Experimente durchgeführt.

Die beiden Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 werden im sich entwickelnden Nervensystem ab HH 10 entlang den Alarplatten des Neuralrohrs exprimiert. Bei der Entwicklung des optischen Tektums werden beiden Proteinen wichtige Funktionen zugesprochen (Matsunaga et al., 2001).

Immundetektion von Pax3 oder Pax7 nach Western Transfer tektaler Gewebelysate zeigte eine nukleäre Lokalisation beider Proteine, wie es auch bei Meis2 und Otx2 der Fall war. Nach Immundetektion von Pax7 war eine Bande bei einer Größe von ca. 57 kDa zu sehen. Mit Hilfe eines Pax3-spezifischen Antikörpers ließ sich eine Bande von ca. 54 kDa nachweisen (Abb. 35B, Nukl). Nach Inkubation des Meis2-GST-Konstruktes mit Zelllysaten aus Mittelhirnen von E 2,5 Hühnchenembryos war eine starke Präzipitation von sowohl Pax7 (Abb. 35A, oben) als auch Pax3 (Abb. 35 A, unten) zu beobachten. Mit dem GST-Protein alleine oder den Sepharose-Kügelchen ohne GST-Protein wurden die Proteine hingegen nicht präzipitiert (Abb. 35A, SK, PD: GST). Somit kann Meis2 in der tektalen Anlage des Hühnchens mit Pax7- und Pax3-Proteinen interagieren.

Um zu überprüfen, ob Meis2 in der tektalen Anlage in Komplexen mit Pax3/7 vorliegt, wurden Ko-Immunopräzipitations-Experimente durchgeführt. Nach Ko-Immunopräzipitation mit einem Meis2-spezifischen Antikörper konnte im Präzipitat eine starke Färbung sowohl für Pax7- als auch für Pax3-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 35B, links). Die Ko-Immunopräzipitation mit einem Kontroll-Antikörper gegen GFP konnte hingegen keines der beiden Pax-Proteine präzipitieren (Abb. 35B, rechts). Präzipitations-Experimente mit den ProteinG-Agarose-Kügelchen alleine zeigten zwar eine minimale Reaktion mit Pax3/7. Diese ist jedoch aufgrund der viel höheren Proteinmengen im eigentlichen Präzipitat der Ko-IPs vernachlässigbar (Abb. 35B, links). Pax7 und Pax3 wurden somit spezifisch mit dem durch den Meis2-Antikörper gebundenen, endogenen Meis2 präzipitiert. Aufgrund der hier aufgeführten Untersuchungen ist davon auszugehen, dass Pax3 und Pax7 in der tektalen Anlage des Hühnchens bei HH 14 – 16 *in vivo* in Komplexen mit Meis2 vorliegen.

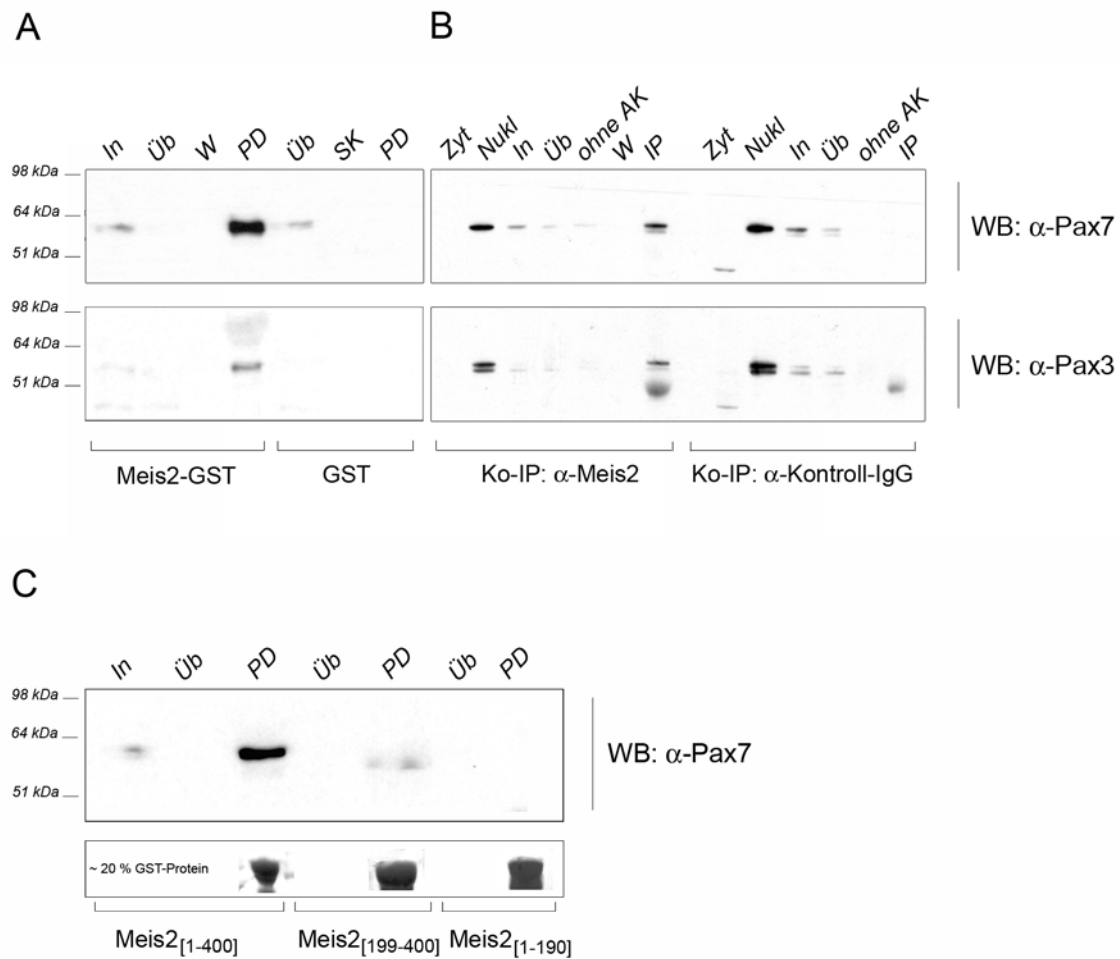


Abbildung 35: Meis2 interagiert *in vitro* und *in vivo* in der tektalen Anlage des Hühnchens mit Pax3 und Pax7. (A) Immundetektion von Pax7 (oben) oder Pax3 (unten) nach PD-Experimenten mit Meis2-GST oder GST alleine. Pax7 und Pax3 präzipitieren mit Meis2-GST, nicht aber mit GST alleine. (B) Ko-Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen Meis2 (links) oder einem nicht-relevanten Antikörper als Kontrolle (rechts). Pax7 und Pax3 präzipitieren mit dem Meis2-Antikörper, nicht aber mit dem Kontroll-Antikörper oder den ProteinG-Agarose-Kügelchen alleine. (C) Immundetektion von Pax7 nach PD-Experimenten mit dem Volllängen-Meis2-GST Konstrukt und den beiden Deletionskonstrukten Meis2 Δ N (Meis2₍₁₉₉₋₄₀₀₎) und Meis2 Δ HD (Meis2₍₁₋₁₉₀₎). (C, unten) Coomassie-Färbung der eingesetzten GST-Fusionsproteine. In: „Input“, eingesetzte Menge an Zelllysate; Üb: Überstand, Zelllysate nach dem Experiment; W: letzter Waschschritt; SK: Sepharose-Kügelchen nach Inkubation mit dem Zelllysate jedoch ohne GST-Proteine; PD: Präzipitat des „Pull-Down“-Experimentes; Zyt: zytosolische Zellfraktion; Nukl: nukleäre Zellfraktion; ohne AK: ProteinG-Agarose Kügelchen nach Inkubation mit dem Zelllysate jedoch ohne Antikörper; IP: Eluat der Immunopräzipitation; WB: „Western Blot“.

Um zu untersuchen, welche Peptidsequenzen von Meis2 an der Interaktion mit Pax7 beteiligt sind, wurden erneut die beiden Deletionskonstrukte von Meis2, Meis2 Δ HD-GST und Meis2 Δ N-GST für PD-Experimente eingesetzt. Nach einem PD-Experiment aus nati-

vem tektalen Gewebelysat mit dem Meis2 Δ HD-GST Konstrukt konnte im Präzipitat kein Pax7 nachgewiesen werden (Abb. 35C, rechts). Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion über die Homeodomäne von Meis2 vermittelt wird. Nach einem PD mit dem Meis2 Δ N-GST Konstrukt hingegen war im Präzipitat Pax7 nachzuweisen. Interessanterweise war die Menge an Pax7-Proteinen hier jedoch geringer als im Präzipitat nach einem PD-Experiment mit dem Meis2-GST-Volllängenkonstrukt, obwohl im Experiment eine einigermaßen vergleichbare oder sogar höhere Mengen an GST-Fusionsprotein eingesetzt wurde (vergleiche Abb. 35C, Meis2₍₁₋₄₀₀₎, PD; Meis2₍₁₋₁₉₀₎, PD). Somit scheint die Interaktion von Meis2 mit Pax7, ähnlich zur Interaktion von Meis2 mit Otx2, über mehrere Proteinsequenzen des Meis2-Proteins vermittelt zu werden. Die beiden Proteinsequenzen schienen auch hier einen unterschiedlichen Einfluss auf die Interaktion auszuüben. Die Interaktion war ohne den N-terminus von Meis2 immer noch aber nur zu einem geringeren Teil möglich. Das Fehlen der Homeodomäne von Meis2 hingegen führte zu einem kompletten Verlust der Interaktionsfähigkeit mit Pax7.

Diese Versuche zeigten also, dass Meis2 in der tektalen Anlage des Hühnchens nicht nur mit Otx2 sondern auch vermutlich mit Pax7 und Pax3 interagiert und somit seine Funktion womöglich durch die Interaktion mit mehreren im Mittelhirn exprimierten Proteinen ausübt.

3.4.6 Meis2 kann in der Augenanlage mit Pax6 interagieren

Meis2 interagiert also in der Anlage des optischen Tektums mit zwei Vertretern aus der Familie der Paired-Box Transkriptionsfaktoren, Pax7 und Pax3. Ein weiterer Vertreter aus dieser Familie ist Pax6. *Pax6* wird im anterioren Bereich des sich entwickelnden zentralen Nervensystems stark im gesamten Dienzephalon und im Großteil des Telenzephalons exprimiert. Ein weiterer Bereich starker *Pax6*-Expression sind die Anlagen der Retinae und der Linsen (siehe Abb. 21A). Im anterioren Bereich des Neuralrohrs gibt es, neben dem Mesenzephalon, eine weitere starke Domäne der *Meis2*-Expression. Diese ist zunächst in den optischen Vesikeln des Embryos zu erkennen und ein wenig später in der Entwicklung ebenfalls in den Anlagen der Retinae und der Linsen (siehe Abb. 9). In der embryonalen Retina und Linse weisen also Meis2 und Pax6 ein ähnliches Muster auf. Immunfluoreszenzfärbungen an Hühnchenembryos des Embryonaltags E 1,5 bestätigten zudem eine Ko-Lokalisation der Proteine Meis2 und Pax6 in Zellen der optischen Vesikel (Heine

et al., 2008). Meis2 reguliert die Expression von *Pax6* in den Anlagen der neuralen Retina, der Linse und im Pankreas (Zhang et al., 2002; Zhang et al., 2006; Heine et al., 2008). Es ist ebenfalls bekannt, dass Pax6 seine eigene Expression regulieren kann. Analysen des „ α -Enhancers“, eines retinaspezifischen regulatorischen Elements des *Pax6*-Gens, wiesen mehrere Konsensus-Bindestellen für Meis-Proteine auf. Mit Hilfe von Reporteranalysen konnte gezeigt werden, dass Meis1 oder Meis2 die Aktivität des α -Enhancer-Reporterkonstruktes stimulieren können. Die Ko-Expression von Meis1 oder Meis2 zusammen mit Pax6 konnte zudem eine Steigerung der Aktivität des Reporterkonstruktes bewirken (Heine et al., 2008). Daher besteht die Möglichkeit, dass Meis2 in der Augenanlage des Hühnchens ein Ko-Faktor von Pax6 ist.

Um dies zu testen, wurden GST-PD-Experimente mit Zelllysaten von HH 14 – 18 Augenanlagen unter Verwendung des Meis2-GST-Volllängenkonstruktes durchgeführt. Meis2-GST führte zu einer starken Präzipitation von Pax6 aus den Zelllysaten. In Kontrollexperimenten mit den Glutathion-Sepharose-Kügelchen alleine oder dem GST-Protein alleine kam es hingegen nicht zu einer Präzipitation von Pax6 (Abb. 36A). Diese Experimente zeigen, dass Meis2 in den Augenanlagen von HH 14 – 18 Hühnchen mit Pax6 interagieren kann.

Die Immundetektion von Pax6 zeigte eine Bande bei 48 kDa, was der erwarteten Größe des Volllängen-Pax6 Proteins entspricht. Die Elution der Proteine erfolgte in diesem Fall in mehreren Schritten. Zunächst wurden die gewaschenen Kügelchen nach dem Experiment zweimal mit Glutathion-Elutionspuffer inkubiert (Abb. 36, E1 und E2). Schließlich erfolgte eine Elution mit Hilfe von 1x SDS-Probenpuffer (Abb. 36, E3). Bemerkenswert ist, dass sowohl in den Zelllysaten als auch in den Eluaten der PD-Experimente unter Verwendung dieses Pax6-Antikörpers stets 3 – 4 weitere starke Banden detektiert wurden. Diese liefen im Tris-Glyzin Gelsystem auf einer Höhe von ungefähr 38 kDa, 35 kDa und 33 kDa. Alle drei Banden waren in den ersten beiden Elutionsschritten des PD-Experimentes dominanter als die Bande bei 48 kDa. Im letzten Elutionsschritt konnte zusätzlich eine vierte Bande bei ca. 42 kDa detektiert werden, die jedoch zuvor, zumindest bei gegebener Belichtungszeit des Films, in den Zelllysaten nicht sichtbar war.

Als zusätzliche Kontrolle wurde der Pax6-Antikörper von der Membran entfernt und es wurde eine Immundetektion zum Nachweis von α -Tubulin, eines ausschließlich zytoplasmatischen Proteins, durchgeführt. Diese Färbung zeigte zwar ein massives Vorhandensein von α -Tubulin in den eingesetzten Zelllysaten. Es kam jedoch nicht zu einer Präzipitation

von α -Tubulin durch das Meis2-GST-Protein, wie in den verschiedenen Eluatn des Experimentes zu sehen ist.

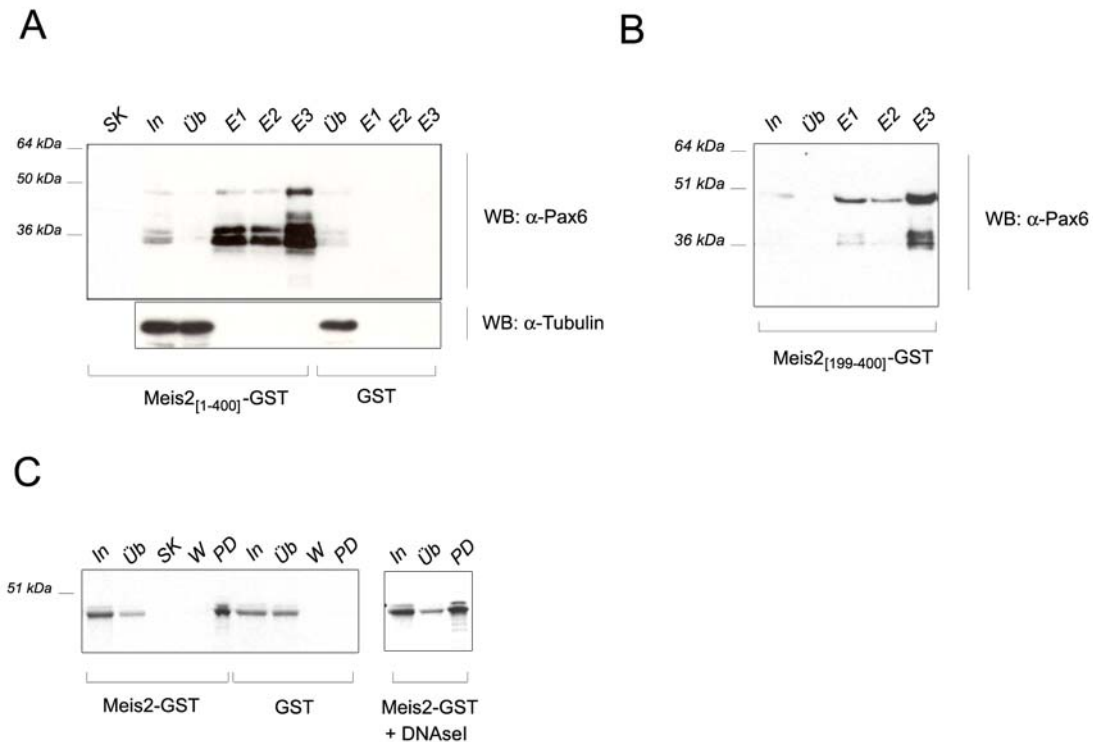


Abbildung 36: Meis2 kann in Augenanlagen des Hühnchens mit Pax6 interagieren. (A) PD-Experimente zeigen eine Interaktion von Pax6 mit dem Meis2-GST Volllängenprotein nicht aber mit GST alleine. Das Protein α -Tubulin wird nicht mit Meis2-GST präzipitiert. (B) Pax6 wird stark mit der Deletionsvariante Meis2 Δ N-GST präzipitiert. (C) PD Experimente mit radioaktiv markiertem *in vitro* translatiertem Volllängen Pax6 Protein mit Meis2-GST oder GST alleine und in Anwesenheit von DNaseI. SK: Sepharose-Kügelchen alleine nach Inkubation mit dem Lysat; In: eingesetztes Zelllysate; Üb: Überstand nach dem Experiment; WB: Western Blot; E1-E3: Elutionsschritte 1-3.

Die Untersuchung mit dem Meis2-GST-Deletionskonstrukt Meis2 Δ N-GST ergab, dass die Interaktion mit Pax6 weiterhin stattfindet, wenn die N-terminale Peptidsequenz 1-190 des Meis2-Proteins fehlt. Die Interaktion schien im gleichen Ausmaß wie mit dem Volllängen-Meis2-GST Konstrukt stattgefunden zu haben (Abb. 36B). Folglich scheint diese Interaktion ausschließlich über die Homeodomäne von Meis2 vermittelt zu werden.

In weiterführenden Experimenten konnte auch eine starke Präzipitation von radioaktiv markiertem, *in vitro* hergestelltem Pax6-Protein nach Experimenten mit dem Meis2-GST beobachtet werden (Abb. 36C). Es ist davon auszugehen, dass sich in der Lösung mit dem *in vitro* hergestellten Pax6-Protein keine weiteren Proteine der Augenanlagen befinden, somit ist die Interaktion von Meis2 mit Pax6 vermutlich direkt. Hier kam es ebenfalls nicht zu einer Präzipitation von Pax6 bei Inkubation der Proteine mit den Sepharose-Kügelchen alleine oder dem GST-Protein alleine (Abb. 36C). Das radioaktiv markierte Volllängen

Pax6 präzipitierte auch mit Meis2-GST nach einer Behandlung des Lysats mit DNaseI. Da die Interaktion also auch in Abwesenheit von DNA stattfinden kann, ist davon auszugehen, dass die Interaktion von Meis2 und Pax6 DNA-unabhängig ist (Abb. 36C, rechts).

3.4.7 Meis2 kann in der Augenanlage mit dem Enzym Parp-1 interagieren

Um weitere Interaktionspartner von Meis2 während der Entwicklung des anterioren ZNS zu identifizieren, wurde die Methode der Massenspektrometrie herangezogen. Dafür wurden zunächst PD-Experimente mit Zelllysaten der Augenanlagen von E 2,5 Hühnchenembryos durchgeführt. Die Proteinproben wurden anschließend mit Hilfe eines präparativen Tris-Glyzin-Gels aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.8.6)

Nach Silberfärbung des Gels nach einem Experiment mit Lysaten aus ca. 400 Augenanlagen war eine starke Bande bei ungefähr 110 kDa nach einem „Pull-Down“ mit Meis2-GST zu erkennen. Nach der Inkubation des Zelllysates mit den Glutathion-Sepharose-Kügelchen alleine oder Inkubation des Zelllysates mit GST alleine war diese Bande nicht vorhanden (Abb. 37).

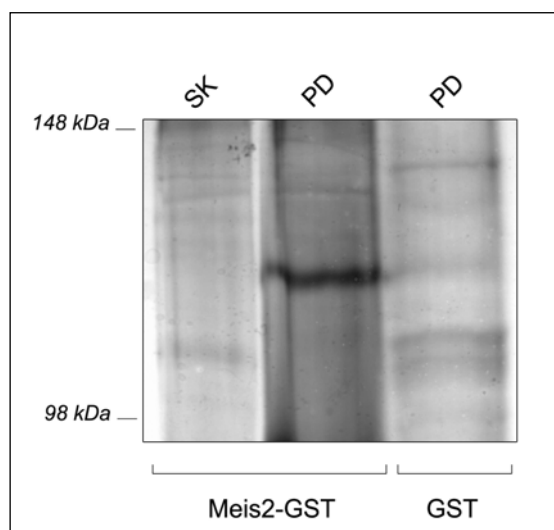


Abbildung 37: Identifizierung von Parp-1 als möglichen Interaktionspartner von Meis2 in E 2,5 Augenanlagen. Eine Silberfärbung nach einem Experiment aus Lysaten von E 2,5 Augenanlagen von Hühnchenembryos zeigte eine prominente Bande bei ca. 110 kDa unter Verwendung des Meis2-GST-Volllängenkonstruktes, nicht aber unter Verwendung von GST alleine oder nach Inkubation des Lysates mit den Sepharose-Kügelchen alleine. SK: Sepharose-Kügelchen nach Inkubation mit dem Zelllysate ohne GST-Protein; PD: Präzipitat des PD Experimentes.

Die Bande wurde im Anschluss an das Experiment ausgeschnitten und von einem Mitglied des Lehrstuhls von Prof. Dr. Michael Karas (J.-W.-Goethe Universität, Frankfurt) mittels MALDI¹-TOF²-Massenspektrometrie analysiert. Diese Analyse identifizierte die Protein-

¹ Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (engl.)

² Time of Flight (engl.)

bande signifikant als Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (Parp-1) aus dem Hühnchen. Eine anschließende Überprüfung des gleichen tryptischen Verdaus mittels des sensitiveren MS/MS-Verfahrens (Tandem-Massenspektrometer), konnte dieses Ergebnis bestätigen. Hierbei konnte das in Parp-1 vorkommende Peptid „TTNFAGILSQGLR“ sequenziert und eindeutig identifiziert werden (Zugangsnummer Sequenzdatenbank NP_990594).

Die Analyse der Expression von Parp-1 mittels Immundetektion nach Western Transfer zeigte, dass Parp-1 in den Augenanlagen und im Mittelhirn von E 2,5 Hühnchen stark exprimiert wird (Abb. 38). Die Auftrennung der jeweiligen Zelllysate in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion zeigte, dass Parp-1 im untersuchten Entwicklungsstadium in beiden Bereichen des Embryos, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, vorhanden ist (Abb. 38, Nukl, Zyt). Die erfolgreiche Zellfraktionierung wurde durch Immundetektion von α -Tubulin auf der gleichen Membran nach Entfernen des Parp-1-Antikörpers überprüft (Abb. 38, unten).

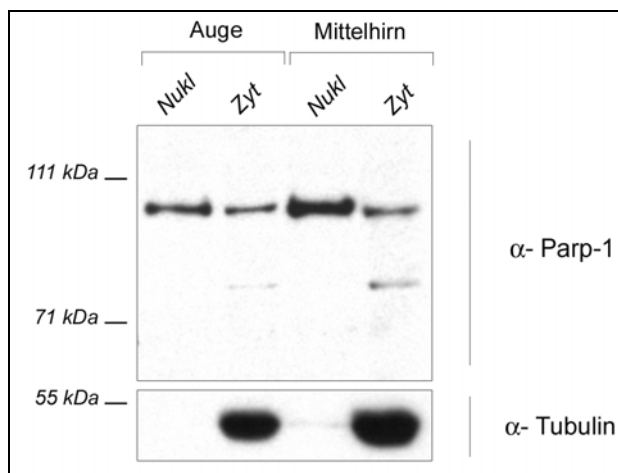


Abbildung 38: Nukleäre und zytoplasmatische Expression des Enzyms Parp-1 in den Augenanlagen und im Mittelhirn des Hühnchens bei E 2,5. Oben: Immundetektion von Parp-1 nach Western-Transfer von nukleären und zytoplasmatischen Zelllysaten aus den Anlagen der Augen und des Tektums von Hühnchenembryos im Alter von E 2,5. Unten: Immundetektion von α -Tubulin auf der selben Membran zur Überprüfung der zytoplasmatischen und nukleären Zellfraktionen. Nukl: nukleäre Zellfraktion; Zyt: zytoplasmatische Zellfraktion.

Nach Immundetektion mit dem Parp-1 Antikörper zeigte sich in beiden Zellfraktionen und in beiden Geweben des Embryos eine dominante Bande bei ca. 100 kDa. Diese Größe liegt ein wenig unter der erwarteten Größe von 113 kDa. Interessanterweise war sowohl in den Augenanlagen als auch in den Mittelhirnen in der jeweiligen zytoplasmatischen Fraktion eine zweite, weniger starke Bande bei ungefähr 80 kDa zu sehen. Diese Banden sind nicht auf unspezifische Reaktionen des Zweitantikörpers zurückzuführen was anhand von Kontrollfärbungen überprüft wurde (nicht gezeigt). Somit ist anzunehmen, dass es sich hierbei um zwei Formen des Parp-1 Enzyms handelt, wovon sich jedoch nur die größere Form auch im Nukleus der Zellen befindet.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von *Meis2* bei der Entwicklung im anterioren Neuralrohr untersucht. Fehl- und Überexpressionsstudien brachten zunächst Aufschluss über eine bislang noch nicht beschriebene Funktion von *Meis2* als Schlüsselprotein bei der Entwicklung des optischen Tektums. Mit Hilfe biochemischer Methoden konnten im Rahmen dieser Arbeit zudem bislang noch nicht bekannte Interaktionspartner von *Meis2* im Mittelhirn und den Augenanlagen identifiziert werden, was ergänzend zu den funktionellen Befunden einen tieferen Einblick in die Funktionsweise von *Meis*-Proteinen im anterioren Neuralrohr ermöglicht.

4.1 *Meis2*-Expression kennzeichnet die Anlage des optischen Tektums

Meis2-Expression beginnt im Mittelhirn des Hühnchens im HH Stadium 11 (Agoston, Diplomarbeit 2005). Somit beginnt die *Meis2*-Expression parallel zur Ausbildung der fünf sekundären Vesikel und kennzeichnet den dritten Vesikel, das Mesenzephalon. Die Expressionsanalyse von *Meis2* mittels *in situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos zeigte, dass die *Meis2*-Expression in diesem Bereich des anterioren Neuralrohrs von Beginn an stark und spezifisch auf den mesenzephalischen Vesikel beschränkt war. Die Expression von *Meis2* ist also, zumindest zu Anfang, nicht dynamisch, sondern bildet bereits zu Beginn seiner Expression strikte Grenzen zu den morphologisch bereits abgegrenzten, benachbarten Vesikeln aus - posterior zum Metenzephalon und anterior zum Dienzephalon (Abb. 9A). Die strikt begrenzte *Meis2*-Domäne im Mesenzephalon wird auch im Laufe der weiteren Entwicklung des Embryos beibehalten. Am Embryonaltag E 2,5 war weiterhin eine klare Abgrenzung der *Meis2*-Expression im Mittelhirn gegenüber benachbarten Regionen zu sehen (Abb. 9B). *In situ* Hybridisierungen auf koronalen Vibratomschnitten des Mittelhirns in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zeigten, dass *Meis2*-Expression HH 15 und HH 19 nahezu ausschließlich auf den dorsalen Bereich des Mittelhirns, also auf die mesenzephalischen Alarplatten, beschränkt war. Ein ähnliches Expressionsmuster war auch im entsprechenden Entwicklungsstadium der Maus zu finden (Abb. 9G). Die starke *Meis2*-Expression in den mesenzephalischen Alarplatten, ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass *Meis2* eine spezifische Rolle bei der Entwicklung des optischen Tektums einnimmt,

da das optische Tektum aus den Alarplatten des Mittelhirns entsteht (siehe Abb. 2). Auffällig ist auch, dass die *Meis2*-Expression in der Maus, verglichen mit der Expression im Hühnchen, eine flächenmäßig kleinere Domäne kennzeichnet. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass das Tektum im Hühnchen wesentlich größer ist als in der Maus.

Das hier beschriebene Expressionsmuster von *Meis2* steht im Gegensatz zu allen anderen bislang beschriebenen Faktoren der Mittel-Hinterhirn-Entwicklung. Wie in der Einleitung ausführlich erläutert, werden die Transkriptionsfaktoren *Pax2/3/5/7/8*, *En1/2* und die sezernierten Moleküle *Wnt1* und *Fgf8* zunächst in weitläufigen Domänen im Neuralrohr exprimiert und werden im Laufe der weiteren Entwicklung auf die MHR beschränkt (siehe Abb. 4). Selbst nachdem die jeweiligen Expressionsdomänen stabilisiert wurden, werden diese Genprodukte sowohl im Mittelhirn als auch im Hinterhirn exprimiert. Die Ausnahme bilden *Wnt1*, welches nur in einem transversalen Ring anterior des MHO und einen schmalen Streifen in der Dachplatte exprimiert wird und *Fgf8*, welches in einem Ring posterior der isthmischen Einschnürung exprimiert wird (Kapitel 1.3.2).

Somit hebt sich die Expression von *Meis2* schon zu Beginn an in zweifacher Hinsicht von anderen bekannten Markern und Regulatoren der Mittelhirnentwicklung ab. Sie ist nicht dynamisch und kennzeichnet von Anfang an und ausschließlich den dorsalen mesencephalischen Vesikel. Der Befund, dass *Meis2*-Expression auch in älteren Stadien, beispielsweise während der Differenzierung der tektumspezifischen Laminierung und später in bestimmten Laminae aufrechterhalten bleibt, spricht dafür, dass *Meis2* auch zu späteren Zeitpunkten der Tektumentwicklung eine Funktion ausübt.

Untersuchungen zur Regulation der *Meis2*-Expression im Mittelhirn gaben Aufschluss über die mögliche Entstehung dieses spezifischen Expressionsmusters. Es zeigte sich, dass *Meis2* einer negativen Regulation durch das sezernierte Molekül *Fgf8*, den Transkriptionsfaktor *Pax6* und das sezernierte Molekül *Shh* unterliegt (Abb. 10). Dabei erfolgt die Unterdrückung von *Meis2*-Expression durch *Fgf8* vermutlich über das Ras-Protein, einer Komponente der *Fgf8* vermittelten Signalkaskade (Vennemann et al., 2008). *Fgf8* wird posterior der isthmischen Einschnürung exprimiert, *Shh* wird von Zellen der Basalplatte sezerniert, und *Pax6* ist in den Zellen des Dienzephalons vorhanden (Wurst und Bally-Cuif, 2001). Es ist also anzunehmen, dass diese negativen Regulatoren eine Expansion der *Meis2*-Expression in das benachbarte Gewebe verhindern und somit das spezifische *Meis2*-Muster im Mittelhirn entstehen lassen (Abb. 39). Ob *Meis2* durch diese Faktoren direkt oder indirekt reguliert wird, geht aus diesen Versuchen nicht hervor. Die Unterdrückung

von *Meis2* nach Fehlexpression einer dieser Faktoren könnte auch als Folge einer Transdifferenzierung, also einer Schicksalsänderung des dorsalen mesenzephalischen Gewebes, gedeutet werden. Denn all die hier im Mittelhirn fehlexprimierten Moleküle können auch das Zellschicksal der Bereiche festlegen, in welchen sie normalerweise exprimiert werden (Wurst und Bally-Cuif, 2001). Aber auch dies würde dafür sprechen, dass *Meis2* ausschließlich Zellen des dorsalen Mittelhirns kennzeichnet, seine Expression während der normalen Entwicklung in anderen Geweben verhindert wird, und die Expression als Folge eines Verlustes von mesenzephalischem Zellschicksal verloren geht.

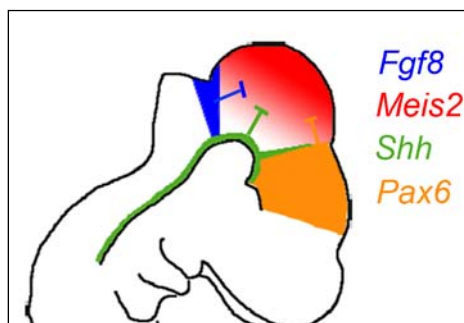


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Regulation der *Meis2*-Expression im Mittelhirn. Eine negative Regulation durch *Fgf8*, *Shh* und *Pax6* verhindert die Expansion der *Meis2*-Expression in benachbarte Regionen bzw. in die Basalplatten und formt so die spezifische Expressionsdomäne in den dorsalen Alarplatten des Mittelhirns.

Die Frage nach der Induktion von *Meis2*-Expression im Mittelhirn wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Im Rahmen einer Diplomarbeit im Labor von Frau Dr. D. Schulte, wurde die Rolle von BMPs bei der Regionalisierung des dorsalen Mittelhirns im Detail analysiert. Hierbei zeigte sich, dass BMPs keinen Einfluss auf die Expression von *Meis2* im Mittelhirn haben (Bobak et al., *Neuroscience Letters*, in Revision).

Neueste Untersuchungen zeigen die Anwesenheit eines neuartigen, Retinsäure-synthetisierenden Enzyms im zum mesenzephalischen Vesikel angrenzenden Ektoderm und später in der Entwicklung in einem schmalen Ring in der MHR (Chambers et al., 2007). Der Zeitpunkt der Expression dieses Enzyms steht mit dem Zeitpunkt der *Meis2*-Induktion im Einklang. Die Induktion von *Meis2* durch Retinsäure konnte bereits in mehreren Systemen gezeigt werden. Retinsäure induziert *in vitro* in P19 embryonalen Karzinomazellen aus der Maus und in den Gliedmaßenknospen von Hühnchen die Expression von *Meis2* (Oulad-Abdelghani et al., 1997; Mercader et al., 2000; Mercader et al., 2005). Des Weiteren wurde auch in humanen embryonalen Karzinomazellen eine durch Retinsäure bedingte Induktion von *Meis2* gefunden (Freemantle et al., 2002). Außerdem konnte auch im Vorderhirn des Hühnchens eine durch Retinsäure vermittelte Induktion von *Meis2* gezeigt werden (Marklund et al., 2004). Somit ist Retinsäure ein Kandidat für die Induktion von *Meis2* im

Mittelhirn. Ein Verlust von RADHL2 und RADHL3, zwei Retinsäure-synthetisierenden Enzymen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Expression von *Meis2* im Vorderhirn der Maus (Molotkova et al., 2007). Da die Retinsäure-Synthese im Mittelhirn, wie von Chambers und Kollegen (2007) vorgeschlagen, jedoch auch über einen anderen enzymatischen Mechanismus laufen könnte, wären hier Untersuchungen mit einem Inhibitor von Retinsäurerezeptoren, beispielsweise BMS 453, eventuell aufschlussreich (Marklund et al., 2004).

4.2 *Meis2* als Schlüsselprotein des tektalen Zellschicksals

Die spezifische Expression von *Meis2* in der frühen Embryonalentwicklung weist auf eine besondere Rolle des Transkriptionsfaktors in der Entwicklung des dorsalen Mittelhirns, der Anlage des optischen Tektums, hin. Um einen tieferen Einblick in die Rolle von *Meis2* bei der Entwicklung des optischen Tektums zu erlangen, wurden mit Hilfe der *in ovo* Mikroelektroporation Fehl- und Überexpressionsstudien durchgeführt. Hierbei wurde die Funktion von *Meis2* durch zwei unterschiedliche experimentelle Herangehensweisen untersucht: Zum einen wurde über das dominant negativ wirkende Konstrukt *Meis2EnR* die *Meis2*-Funktion unterdrückt, zum anderen lieferte die Fehlexpression von *Meis2* in verschiedenen Bereichen des Neuralrohrs Erkenntnisse über die Bedeutung des Transkriptionsfaktors bei der Entwicklung des Nervensystems.

Histologische Untersuchungen nach Überexpression des *Meis2EnR*-Konstruktes zeigten, dass *Meis2* in mehreren Aspekten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Tektumentwicklung eine Rolle spielt. Bereits 24 h nach Überexpression von *Meis2EnR* im Mittelhirn konnte eine Störung der Axonfaszikulierung des MLFs und des LLFs, zwei frühen Axonbündelungen im Mittelhirn, in den transfizierten Bereichen beobachtet werden (Abb. 11). Zudem konnte an mit *Meis2EnR*-elektroporierten Embryos späterer Entwicklungsstadien eine Fehlentwicklung der tektumspezifischen Laminierung beobachtet werden (Abb. 12). Der MLF und der LLF sind zwei prominente Axonbündelungen der ersten ausdifferenzierten Neurone, die ihren Ursprung in der Mittel-Vorderhirngrenze haben und durch das Mittelhirn zum Hinterhirn ziehen. Die Axonbündelungen werden früh ausgebildet und sind im Hühnchen bereits im Stadium HH 14 sehen (Ahsan et al., 2007). Da der Funktionsverlust von *Meis2* einen negativen Einfluss auf die Bündelung der Axone des MLFs und des LLFs hatte, ist davon auszugehen, dass *Meis2* bereits in diesen frühen

Stadien eine Funktion im Mittelhirn einnimmt. Die Ausbildung der tektumspezifischen Laminierung hingegen beginnt erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung, ungefähr ab E 4 (Mey und Thanos, 2000). Damit ist die *Meis2EnR*-bedingte Fehlentwicklung der tektumspezifischen Laminierung also ein Hinweis darauf, dass *Meis2* auch in späteren Aspekten der Tektumentwicklung eine wichtige Rolle einnimmt.

Eine weitaus bedeutendere Erkenntnis bezüglich der Funktion von *Meis2* lieferten Fehl-expressionsstudien von *Meis2HA* in unterschiedlichen Bereichen des Neuralrohrs. Hierbei zeigte sich, dass *Meis2* in der Lage ist, im dorsalen Dienzephalon ein ektopisches Tektum zu induzieren. Dies konnte sowohl 6 als auch 11 Tage nach Elektroporation von *Meis2HA* ins Dienzephalon zunächst anhand von kugelförmigen Auswüchsen des Gewebes auf der elektroporierten Seite beobachtet werden (Abb. 18, 19). Diese Strukturen wiesen eine tektumspezifische Histologie und Proteinexpression auf. Das ektopische Gewebe besaß Pax7- und *Meis2*-positive Zellen, die während der normalen Entwicklung nicht im Dienzephalon, jedoch im optischen Tektum zu finden sind (Abb. 18C – C'', 19B). Außerdem waren diese Zellen in einer für das Tektumgewebe charakteristischen Laminierung angeordnet – das Gewebe des Dienzephalons ist hingegen nicht laminiert. Darüber hinaus konnte im Bereich des ektopischen Gewebes ein Verlust des dienzephalischen Markers Pax6 beobachtet werden, was die Vermutung einer Schicksalsänderung des Gewebes stützt (Abb. 18E, E'). Bemerkenswert war hier die Ähnlichkeit der ektopischen, tektalen Strukturen zu den wildtypischen Tekta der entsprechenden Entwicklungsstadien. Obwohl die Größe der ektopischen Tekta bei weitem nicht der Größe der entsprechenden wildtypischen Tekta entsprach, fand sich hier annähernd die gleiche Anzahl und Anordnung der tektalen Schichtungen, wobei das ektopische Tektum stets ein wenig in der Entwicklung zurückzuliegen schien (vergleiche Abb. 18C'', D, Abb. 19B, C). Zudem konnten weitere, in dieser Arbeit nicht aufgeführte Immunfärbungen, sogar die Existenz einer Neurofilament-positiven Schicht am äußersten Rand der ektopischen Tekta zeigen, welche stark an das *Stratum opticum* erinnerte. Dieses besteht im wildtypischen Tektum aus den innervierenden Axonen retinaler Ganglienzellen. Somit untermauert dieser Befund die Annahme, dass *Meis2* zur Induktion und Entwicklung eines ektopischen Tektums führen kann. Noch ist allerdings unklar, ob die ektopischen Tekta tatsächlich von retinalen Ganglienzellaxonen innerviert werden. Dies könnte mit Hilfe retrograder Färbungen in retinalen Ganglienzellaxonen untersucht werden. *Meis2* ist also nicht nur erforderlich für die Entwicklung des optischen Tektums. *Meis2* ist außerdem dazu imstande in einem

Gewebe, dessen ursprüngliches Schicksal es gewesen wäre dienzephalisches Gewebe zu bilden, die Entwicklung eines scheinbar nahezu vollständigen optischen Tektums zu induzieren.

Es sind neben *Meis2* bereits eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren beschrieben worden, die im Dienzephalon die Entwicklung tektaler Strukturen induzieren können. Wird einer der Transkriptionsfaktoren *Pax2/5*, *Pax3/7*, *En1/2* oder die sezernierten Moleküle *Wnt1* und *Fgf8* im Dienzephalon fehlexprimiert, so kommt es zur Induktion tektaler Strukturen. Wie bereits erläutert, liegt dem Mechanismus der Tektuminduktion hierbei eine Beteiligung dieser Proteine in einer positiven Rückkopplungsschleife des MHO zugrunde. Die Fehlexpression eines dieser Faktoren geht auch stets mit der Induktion einiger anderer MHO-assoziiierter Gene einher. Dabei wird jedoch ausnahmslos das sezernierte Molekül *Fgf8*, das Schlüsselmolekül für die organisatorische Aktivität des MHO, induziert. Die Induktion der anderen Faktoren und die daraus resultierende positive Rückkopplungsschleife führen also, über die Induktion von *Fgf8*, stets zur Entstehung eines ektopischen MHO im Dienzephalon. Dies ist der einzige, bislang beschriebene mögliche Mechanismus einer Induktion ektopischer tektaler Strukturen (Bally-Cuif et al., 1992; Araki und Nakamura, 1999; Funahashi et al., 1999; Okafuji et al., 1999; Shamim et al., 1999; Sugiyama et al., 1998, Martinez, 2001; Matsunaga et al., 2001; Nakamura, 2001b).

Wie Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, ist *Meis2* jedoch nicht Bestandteil der positiven Rückkopplungsschleife der Gene des MHO. Die Fehlexpression von *Meis2HA* führte 24 h nach Elektroporation nicht zu einer Induktion von *Pax2*, *Pax3*, *En1* oder *Fgf8* im Dienzephalon (Abb. 25, 26A – B'). Des Weiteren hatte die Überexpression des dominant negativen *Meis2EnR* im Mittelhirn keinen Einfluss auf die Expression von *Pax2*, *Pax3*, *Pax5*, *Pax7*, *Wnt1*, *En1*, und *En2* (Abb. 24 und Agoston, Diplomarbeit 2005). Auch 48 h nach Elektroporation von *Meis2HA* konnte weder eine Induktion von *Pax7*, *Pax2*, *Wnt1* noch eine Induktion von *Fgf8* im Dienzephalon beobachtet werden (Abb. 26C – D', Abb. 28). Selbst 96 h, also 4 Tage, nach Elektroporation war keine ektopische *Wnt1*- oder *Fgf8*-Expression im Bereich des elektroporierten Gewebes nachweisbar (Abb. 29). Bemerkenswerterweise waren aber bereits 48 h nach Elektroporation von *Meis2HA* im Dienzephalon, im Bereich starker ektopischer *Meis2*-Expression ektopische Auswüchse zu erkennen, welche auf eine beginnende Ausdifferenzierung tektalen Gewebes im Dienzephalon hinweisen (Abb. 28A', B).

Die Genexpressionsanalyse dieser Zeitreihe brachte eine weitere bemerkenswerte Erkenntnis. *In situ* Hybridisierungen auf koronalen Vibratomschnitten des Dienzephalons 4 Tage nach Elektroporation von *Meis2HA* zeigte die Anwesenheit *En1*-spezifischer Transkripte im ektopischen Gewebe (Abb. 29D). Dies konnte jedoch nur auf einem Schnitt von insgesamt zwei untersuchten Schnitten in zwei verschiedenen Embryos beobachtet werden und müsste daher noch einmal verifiziert werden. Da die Expression von *En1* erst 96 h nach Elektroporation von *Meis2HA* und nicht bereits nach 24 h induziert wurde, ist *En1* vermutlich nicht an der *Meis2*-vermittelten Induktion tektaler Entwicklung beteiligt bzw. wird dafür nicht benötigt. Die Expression von *En1* im ektopischen Gewebe könnte jedoch durchaus ein wichtiger Aspekt in der weiteren Entwicklung des ektopischen Tektum sein. Wie bereits in der Einleitung erläutert, nimmt *En1*, neben der Beteiligung in der Etablierung des MHO, auch eine besondere Rolle bei der Entstehung tektaler Polarität ein (Logan et al., 1996; Nakamura, 2001a). Somit könnte dieses Ergebnis also auf eine mögliche Polarität des durch *Meis2* induzierten ektopischen Tektums hindeuten. Allerdings erfordert die Bestätigung dieser Hypothese weitere Untersuchungen.

Die Tatsache, dass die Fehlexpression von *Meis2HA* im Dienzephalon selbst innerhalb von 96 h keines der hier untersuchten Gene und vor allem nicht *Fgf8* induzierte, ist bemerkenswert und steht im Gegensatz zu allen bisherigen Untersuchungen zur Induktion ektopischer tektaler Strukturen. Denn die Induktion tektaler Strukturen durch eines der in der MHR beteiligten Proteine geht spätestens 24 h nach Elektroporation des entsprechenden Faktors zumindest mit einer Induktion von *Fgf8* einher (Araki und Nakamura, 1999; Funahashi et al., 1999; Okafuji et al., 1999; Matsunaga et al., 2001). Matsunaga und Kollegen (2001) konnten beispielsweise bereits 12 h nach Elektroporation von *Pax7* eine schwache und nach 18 h eine starke Induktion von *Fgf8*-Expression beobachten. Bis zum untersuchten Zeitpunkt von 48 h nach Elektroporation des *Meis2HA*-Konstruktes, konnte zudem auch nicht eine Induktion von *Pax2*, einem möglichen *Fgf8*-induzierenden Faktor, beobachtet werden (Abb. 28 A'', Ye et al., 2001).

Eine durch *Meis2*-bedingte Schicksalsänderung des Dienzephalons in mesenzephalisches Gewebe erfolgte jedoch bereits nach 24 h. Dies wird durch zwei Befunde gestützt: Erstens führte die Fehlexpression von *Meis2HA* 24 h nach Elektroporation zu einem Verlust von *Pax6*-Expression im Dienzephalon (Abb. 21). *Pax6* wird stark im sich entwickelnden Vorderhirn exprimiert und seine Expression grenzt im Dienzephalon scharf an das Mesenzephalon. Es wird angenommen, dass *Pax6*, in Kooperation mit anderen Faktoren,

diencephalisches Gewebe und die Grenze zwischen Di- und Mesenzephalon festlegt. Folglich geht die Induktion tektaler Strukturen im Diencephalon stets mit einem Verlust von *Pax6* einher. Andersherum führt die Fehlexpression von *Pax6* zu einer Unterdrückung mittelhirnspezifischer Genexpression, wie auch in der vorliegenden Arbeit anhand der Unterdrückung von *Meis2* gezeigt werden konnte (Abb. 10, Nomura et al., 1998; Araki und Nakamura, 1999; Schwarz et al., 1999; Matsunaga et al., 2000; Kimura et al., 2005). Der Verlust von *Pax6*-Expression im Diencephalon durch *Meis2HA*-Transfektion, ist ein Hinweis darauf, dass das Gewebe seinen ursprünglich diencephalischen Charakter verloren hat. Zweitens führte die Fehlexpression von *Meis2HA* 24 h nach Elektroporation im Diencephalon zur Induktion von *ephrinB1*, eines tektalen Markergens (Abb. 15). Dieser Befund untermauert zum einen die bereits durch Fehlexpression von *Meis2EnR* gewonnene Erkenntnis, dass *ephrinB1* ein Zielgen von *Meis2* ist. Zum anderen zeigt dieser Befund, dass eine durch *Meis2* bedingte Unterdrückung diencephalischen Charakters auch gleichzeitig mit einer Induktion tektalen Schicksals einhergeht. Dabei ist davon auszugehen, dass beide Schritte sequentiell erfolgen. So kommt es zuerst zu einem Verlust von *Pax6* und anschließend zu einer Induktion von *ephrinB1*. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht detaillierter untersucht. Auch lässt sich anhand der vorliegenden Befunde keine Aussage darüber machen, ob die Regulation dieser Gene von *Meis2* direkt oder indirekt erfolgt ist. Anhand der in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse lässt sich jedoch festhalten, dass sich beide Vorgänge innerhalb von 24 h nach Transfektion des *Meis2HA*-Konstruktes und ohne die Induktion von *Fgf8* ereignet haben.

Eine mögliche Erklärung dafür, wie *Meis2* auch ohne die Induktion eines ektopischen Mittel-Hinterhirn Organisators die Entwicklung eines ektopischen Tektums auch nachhaltig beeinflussen könnte, lieferten folgende Beobachtungen. Allem Anschein nach induziert *Meis2HA*-Fehlexpression endogene *Meis2*-Expression im Diencephalon. *In situ* Hybridisierungen auf Vibratomschnitten mit einer *Meis2*-spezifischen Sonde zeigten bis zu 5 Tage nach Elektroporation, (dem ältesten in diesem Zusammenhang untersuchten Entwicklungsstadium) ein massives Vorhandensein von *Meis2*-Transkripten. Zunächst war eine starke *Meis2*-Expression im gesamten elektroporierten Gewebe und später nahezu ausschließlich in den ektopischen Strukturen nachzuweisen (Abb. 29A, C'). Die starke *Meis2*-Expression kann bis zu etwa 24 bis 48 h nach Elektroporation, auf die ektopische Expression des *Meis2HA*-Konstruktes zurückgeführt werden. Da hier die Elektroporation des *Meis2HA*-Gens, im Gegensatz zu retroviraler Fehlexpression, nur eine transiente

Expression des Konstruktes erlaubt, wird das Konstrukt aufgrund der Zellteilungen zunehmend weniger exprimiert. Angesichts dieser Tatsache ist also davon auszugehen, dass die *Meis2*-Expression im Bereich der sich entwickelnden ektopischen Struktur aktiv aufrechterhalten wird. Dieser Befund wird auch durch Immunfärbungen der ektopischen Tekta 6 Tage nach Elektroporation von *Meis2HA* gestützt. Eine Färbung des HA-Anteils von *Meis2HA* zeigte lediglich ein paar vereinzelte, positive Zellen, wohingegen die *Meis2*-Expression stark war (vergleiche Abb. 18C', F). Somit wird in den ektopischen Tekta eine endogene *Meis2*-Expression induziert. Dies weist zum einen auf ein wirkliches tektales Schicksal des Gewebes und zum anderen eröffnet es die Möglichkeit, allein über die Aufrechterhaltung von *Meis2* die Entwicklung tektaler Strukturen auch über längere Zeiträume hinweg zu kontrollieren. Ob *Meis2* hierbei direkt oder indirekt für die Induktion seiner eigenen Expression verantwortlich ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erschlossen.

An dieser Stelle ist noch anzumerken, dass *Meis2*-Expression, im Gegensatz zur *Meis2*-Funktion, während der normalen Entwicklung des Tektums zumindest indirekt von der organisatorischen Aktivität des MHO abhängig zu sein scheint. *Fgf8* unterdrückt die Expression von *Meis2* im Mittelhirn (Abb. 10A). Die Unterdrückung des *Fgf8*-Signals im Hinterhirn, durch die Fehlexpression eines dominant negativ wirkenden Ras-Proteins, führt zur Transformation des Metenzephalons zu mesenzephalischem Gewebe (Sato und Nakamura, 2004; Suzuki-Hirano et al., 2005). Meine hier nicht näher dargestellten Untersuchungen zeigten, dass diese Schicksalsänderung auch mit einer Induktion von *Meis2*-Expression im ektopischen Gewebe einherging. Die Induktion von *Meis2* war jedoch erst 48 h nach Elektroporation des dominant negativen Ras-Proteins zu detektieren, was auf einen indirekten Effekt hinweist (Vennemann et al., 2008).

Anhand der hier vorliegenden Befunde ist davon auszugehen, dass *Meis2*, im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Regulatoren der Mittelhirnentwicklung, in der Lage ist, sowohl die Transdifferenzierung des dienzephalischen Gewebes als auch die Induktion und Entwicklung tektaler Strukturen bereits 24 h nach Fehlexpression zu ermöglichen, ohne jedoch dabei Bestandteil der positiven Rückkopplungsschleife des MHO zu sein. Somit ist die hier durch *Meis2* bedingte Induktion tektalen Zellschicksals bislang einzigartig und impliziert für die Funktion von *Meis2* eine bisher noch nicht beschriebene Position in der Tektumentwicklung. Anders als alle bislang beschriebenen Faktoren, scheint die Induktion tektaler Entwicklung durch *Meis2* keinen ektopischen Organisator zu benötigen. Vielmehr

sprechen diese Befunde dafür, dass die *Meis2*-Funktion in der Hierarchie der Tektumentwicklung nach der Entstehung des MHO einzuordnen ist. Übertragen auf die normale Entwicklung des optischen Tektums könnte hier ein Modell für die Funktion von *Meis2* aufgestellt werden, in welchem *Meis2*, nach Etablierung der MHR, als letzte Instanz die endgültige Induktion eines tektalen Zellschicksals und somit die Entwicklung des optischen Tektums auslösen würde.

Das Expressionsmuster von *Meis2*, verglichen mit der Expression der anderen Faktoren der Mittelhirnentwicklung, unterstützt dieses Modell in jeglicher Hinsicht. Die *Meis2*-Expression beginnt erst nach Induktion der anderen Gene des MHO (siehe Kapitel 1.3 und Abb. 9). Zweitens bleibt die Expression von *Meis2* im Gegensatz zu anderen MHO-assoziierten Genen auf das mesenzephalische Vesikel beschränkt. Diese werden auch im benachbarten Hinterhirn exprimiert, was die Spezifizierung einer Region schwer möglich macht. *Meis2*-Expression hingegen hat genau die für die Spezifizierung einer Region erforderlichen Attribute – es wird ausschließlich in einem bestimmten Bereich exprimiert und vermag die Entwicklung dieser Strukturen zu regulieren.

Bislang galt die Annahme, dass die Festlegung tektalen Schicksals lediglich über die in der MHR exprimierten Gene *Pax2/3/5/7* und *En1/2* in Kombination mit dem anterioren Markergen *Otx2* erfolgt (Wurst und Bally-Cuif, 2001; Nakamura, 2001b; Nakamura et al., 2005). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse widersprechen dieser Theorie keineswegs; sie ergänzen sie vielmehr und schließen mit der Beschreibung eines ausschließlich regionalspezifisch exprimierten, Tektum-induzierenden Transkriptionsfaktors eine Lücke in der Entwicklung des optischen Tektums.

4.3 *Meis2* als tektumspezifischer Ko-Faktor von *Otx2*

Biochemische Untersuchungen zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von *Meis2* brachten schließlich Aufschluss darüber, wie *Meis2* die Festlegung tektalen Zellschicksals zu regulieren vermag. Ko-Immunopräzipitationen mit einem *Meis2*-spezifischen Antikörper aus nativem tektalen Gewebe zeigten, dass *Meis2* in HH 14 – 18 Mittelhirnen des Hühnchens in Komplexen mit *Otx2* vorliegt (Abb. 30). *Meis*-Proteine sind Ko-Transkriptionsfaktoren und wurden bislang als Interaktionspartner von Hox- und/oder PBX-Proteinen beschrieben (Mann und Affolter, 1998). Weitere Interaktionspartner von *Meis*-Proteinen sind myogene bHLH-Proteine (Knoepfler et al., 1999; Berkes et al., 2004).

Dieser Befund beschreibt somit einen neuen Interaktionspartner von *Meis2* im anterioren Neuralrohr der Vertebraten. Überdies ist diese Erkenntnis ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Festlegung tektalen Zellschicksals durch *Meis2* als transkriptionellen Ko-Faktor von *Otx2* erfolgen könnte.

Dieser Befund zusammen mit den Erkenntnissen zur Rolle von *Meis2* in der tektalen Entwicklung erlaubt nun die Annahme folgender Theorie: die Expression von *Otx2* legt zunächst den anterioren Bereich des Neuralrohrs fest. Der Bereich, der darauf folgend *Meis2* exprimiert, entwickelt sich im weiteren Verlauf über eine kooperative Interaktion von *Meis2* und *Otx2* zum optischen Tektum (zum Vergleich der Expressionsmuster siehe Abb. 39). Die Interaktion ermöglicht dabei vermutlich die Aktivierung tektumspezifischer Genexpression. Verschiedene genetische Strategien, die es erlaubten, das *Otx2*-Gen zu definierten Zeitpunkten der Entwicklung auszuschalten, zeigten, dass *Otx2* wichtige Funktionen auch insbesondere bei der Festlegung tektaler Strukturen in einem Zeitfenster zwischen E 10,5 und E 16,5 in der Maus erfüllt (Vernay et al., 2005; Fossat et al., 2006). Die hier beobachteten Befunde einer Komplexbildung von *Otx2* und *Meis2* in Mittelhirnen bei korrespondierenden Entwicklungsstadien HH 14 – 18 des Hühnchens stehen mit zuletzt genannten Untersuchungen im Einklang.

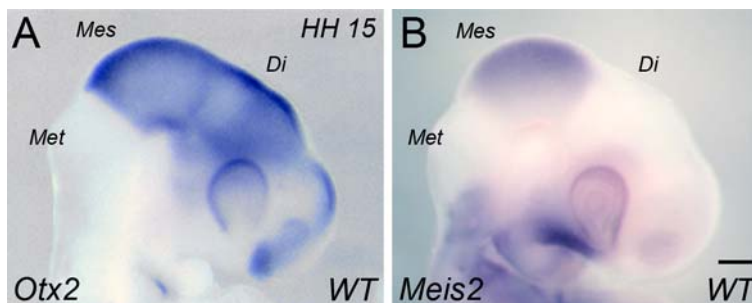


Abbildung 39: Vergleich der wild-typischen Expression von *Otx2* und *Meis2* bei HH 15. *In situ* Hybridisierungen an ganzen Embryos zeigen Expression von *Otx2* (A) und *Meis2* (B). Met: Metenzephalon; Mes: Mesenzephalon; Di: Diencephalon; WT: Wildtyp. Maßstab: 200 µm.

Untersuchungen zur Fehlexpression von *Meis2HA* in unterschiedlichen Bereichen des Neuralrohrs unterstützen die Annahme, dass die Kooperation von *Otx2* und *Meis2* für die Funktion von *Meis2*, tektale Entwicklung zu induzieren, notwendig ist. Sowohl die Induktion des tektalen Markergens *ephrinB1*, als auch die Entwicklung eines ektopischen Tektums konnte nur im Bereich anterior der Mittel-Hinterhirn Grenze beobachtet werden, nicht jedoch bei Fehlexpression von *Meis2HA* im Metenzephalon (Abb. 16, 20). Diese Befunde stehen im Einklang mit der Tatsache, dass *Otx2*-Expression an der Grenze zur isthmischen Einschnürung endet (Abb. 39A). Somit ist *Meis2* nicht in der Lage, außerhalb der *Otx2*- Domäne tektales Schicksal zu induzieren.

Die Anwesenheit von *Otx2* scheint jedoch nicht die einzige entscheidende Voraussetzung dafür zu sein, dass *Meis2* tektale Entwicklung induzieren kann. So erfolgte die Induktion eines ektopischen Tektums ausnahmslos im dorsalen Bereich des Dienzephalons. Dieser Beobachtung könnten zwei mögliche Ursachen zugrunde liegen. Das sezernierte Molekül *Shh* wird auch in der Bodenplatte entlang des Dienzephalons exprimiert (Wurst und Bally-Cuif, 2001). Somit ist davon auszugehen, dass auch im ventralen Dienzephalon der ventralisierende Effekt von *Shh*, also eine Unterdrückung dorsaler Charakteristika, vorliegt. Im Einklang damit, steht auch der Befund, dass die Überexpression von *Shh* im Mesenzephalon die *Meis2*-Expression hemmte (Abb. 10). Daher wäre es durchaus vorstellbar, dass eine *Meis2*-bedingte Induktion tektaler Strukturen und die damit einhergehende Expression von *Meis2*, *ephrinB1* und *Pax7* im ventralen Dienzephalon nicht möglich ist. Überdies könnte die Fähigkeit von *Meis2*, tektale Entwicklung zu induzieren, eine zusätzliche Permissivität des Gewebes erfordern, die nur im dorsalen Bereich des Dienzephalons gegeben ist. In diesem Punkt wäre es vorstellbar, dass die endogenen Expressionsdomänen von *Fgf8* und *Wnt1* (Abb. 28, 29) zusammen mit der Expression von *Otx2* im dorsalen Dienzephalon einen solch permissiven Einfluss auf das Gewebe ausüben könnten.

Hinweise auf die funktionelle Relevanz der Interaktion von *Meis2* und *Otx2* lieferten weitere Fehlexpressionsstudien. Es konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der *Meis2*-Funktion einer *Otx2*-vermittelten tektalen Entwicklung im Metenzephalon entgegenwirken kann (Abb. 33). Bemerkenswert war hierbei, dass die Fehlexpression von *Otx2* alleine, obwohl nur in die rechte Seite des Embryos elektroporiert, stets in der Entwicklung von zwei ektopischen Tekta resultierte (Abb. 33C, F). Dies steht nicht im Einklang mit der bereits erwähnten Studie von Katahira und Kollegen (2000). Sie beobachteten lediglich ein ektopisches Tektum auf der rechten Seite. Die Ursache hierfür könnte darin begründet werden, dass die Versuche der vorliegenden Arbeit eventuell an jüngeren Embryos durchgeführt wurden, so dass nicht nur eine Hälfte, sondern die gesamte Region elektroporiert wurde. Katahira und Kollegen (2000) beschrieben jedoch auch eine *Otx2*-vermittelte nicht-zellautonome Induktion von *Fgf8*, was wiederum für die Möglichkeit sprechen könnte, dass zwei ektopische Tekta induziert werden.

Diese Tatsache könnte auch die Ursache dafür sein, dass die Ko-Elektroporation von *Meis2**EnR* stets nur zu Entwicklungsstörungen in einem, dem rechten ektopischen Tektum führte. Die Effekte der *Meis2*-Funktionsunterdrückung sind vermutlich zellautonome Vor-

gänge (Abb. 13). Somit ist davon auszugehen, dass sich ein vermeintlicher Effekt des dominant-negativen Konstruktes nur in den elektroporierten Zellen auswirkt. Die zell-autonome Wirkungsweise von *Meis2* könnte auch die Ursache dafür sein, dass sich die Ko-Elektroporation von *Meis2EnR* lediglich in einer Störung der Otx2-vermittelten tektalen Entwicklung niederschlug. Im Normalfall resultiert die Elektroporation eines Konstruktes in einer fleckenartigen Transfektion des Gewebes. Das bedeutet, dass nicht jede Zelle, sondern nur kleine Gruppen von Zellen das Konstrukt aufnehmen und exprimieren. Die anderen, den transfizierten Bereichen benachbarte Zellen exprimieren weiterhin endogen das normale *Meis2*-Protein. Dies ist anhand der *Meis2EnR*-vermittelten Unterdrückung von *ephrinB1* im Mittelhirn gut zu sehen. Die *ephrinB1*-Expressionsdomäne ist fleckenartig von Bereichen ohne *ephrinB1*-Expression durchbrochen, und zwar in den Bereichen, die *Meis2EnR* exprimieren (Abb. 13). Es kam nicht zu einem kompletten Verlust der *ephrinB1*-Expression im Mittelhirn. Dies wäre also eine mögliche Erklärung dafür, weshalb *Meis2EnR* die Otx2-vermittelte met- zu mesenzephalische Transformation nicht vollständig verhindert hat. Die Zellen, die kein *Meis2EnR* exprimieren, reagieren normal auf die Signalwirkung von Fgf8, dessen Expression durch die Otx2-Fehlexpression induziert wurde. Im Einklang mit der hier aufgeführten These steht auch die Beobachtung, dass ektopische tektale Strukturen im Dienzephalon nur in Bereichen entstanden sind, in welchen eine zusammenhängende, massive Expression des *Meis2HA*-Konstruktes vorlag. Zusätzlich erwähnenswert ist, dass Untersuchungen nach Fehlexpression von *Otx2* eine Induktion von *Meis2* im elektroporierten Gewebe bereits 24 h nach Elektroporation, und damit noch vor einer augenscheinlichen Transformation des Gewebes, bestätigten konnten (Abb. 33A, B). Dies stützt weiterhin die These, dass eine Interaktion von Otx2 und *Meis2* für die Induktion tektaler Strukturen erforderlich ist. Interessanterweise konnte, wie bereits erwähnt, im Gegensatz dazu nach Fehlexpression von Ras^{N17} ins Metenzephalon erst 48 h und damit erst parallel zur augenscheinlichen Transformation des Gewebes, eine Induktion von *Meis2* beobachtet werden (Vennemann et al., 2008).

Biochemische Untersuchungen identifizierten eine 18 Aminosäure lange Proteinsequenz am N-terminus der Homeodomäne des Otx2-Proteins, welche die Interaktion zu *Meis2* vermittelt (Abb. 32). Eine Interaktion mit dem N-terminus der Homeodomäne von Otx2 wurde bereits zuvor für den Interaktionspartner Sox2 beschrieben. Hier waren jedoch zusätzlich auch andere Proteinsequenzen von Otx2 beteiligt (Danno et al., 2008). Somit unterscheidet sich die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Interaktionsdomäne von

Otx2 mit Meis2 von der bereits beschriebenen Interaktionsdomäne von Otx2 zu Sox2. Sie unterscheidet sich auch von der Domäne, welche die bereits beschriebene Interaktion von Otx2 zu dem Ko-Repressor Grg4/Tle4 vermittelt (Puelles et al., 2004, Heimbucher et al., 2007). Hier wird die Interaktion über das Eh1-Motiv C-terminal der Homeodomäne von Otx2 vermittelt. Somit binden Meis2 und Grg4/Tle4 unterschiedliche Domänen des Otx2-Proteins.

Die Fehlexpression der Deletionsvariante des Otx2-Proteins *Otx2Δ1-153* war nicht imstande, im Metenzephalon ektopische Tekta zu induzieren (Abb. 34). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die funktionelle Relevanz der Interaktion von Meis2 und Otx2 sein, da die Deletion im Otx2-Protein die Interaktionsdomäne mit Meis2 beinhaltet (Abb. 32). Weitere Experimente zeigten jedoch, dass die Deletionsvariante auch nicht die Expression von *Meis2* zu induzieren vermochte, was eigentlich unabhängig von Meis2 stattfinden sollte und somit eher dafür spricht, dass dieses Otx2 nicht funktionstüchtig ist (Abb. 34). Durch die Deletion der ersten 53 Aminosäuren fehlen auch die ersten N-terminalen Aminosäuren der Homeodomäne von Otx2, so dass eventuell eine DNA-Bindung nicht mehr möglich war. Somit kann das Ausbleiben der Entwicklung ektopischer Tekta nicht allein auf die fehlende Interaktionsmöglichkeit mit Meis2 zurückgeführt werden. Mehr Aufschluss würden hier eventuell weiterführende biochemische Analysen liefern. Sie könnten die Beteiligung einzelner, wichtiger Aminosäuren an der Interaktion identifizieren. Gesetzt den Fall, eine Interaktion von Meis2 und Otx2 wäre auch ohne die N-terminalen Aminosäuren der Homeodomäne von Otx2 möglich, könnte durch gezielte Mutationen der entsprechenden Aminosäuren eine Deletionsvariante erschaffen werden, die nicht mehr mit Meis2 interagieren kann jedoch in allen anderen Aspekten funktionstüchtig ist.

Untersuchungen zur funktionellen Relevanz einer Interaktion von Meis2 und Otx2 brachten Aufschluss über einen neuartigen, möglichen Mechanismus zur Festlegung tektalen Schicksals. Meis2 ist ein transkriptioneller Aktivator, wie Untersuchungen unseres Labors zeigen konnten (unveröffentlichte Daten). Daher lag zunächst die Vermutung nahe, dass eine Interaktion mit dem Ko-Transkriptionsfaktor Meis2 das Aktivierungspotential von Otx2 steigern könnte. Diese Idee wurde mit Hilfe eines Otx2-abhängigen *in vitro* Luziferase-Reportersystems getestet, und konnte jedoch nicht bestätigt werden (Diagramm 1).

Weiterführende Versuche mit dem Otx2-abhängigen Reportersystem zeigten jedoch, dass Meis2 einer Grg4/Tle4-vermittelten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von Otx2 entgegenwirken kann (Diagramm 2). Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten bereits eine Interaktion des Ko-Repressors Grg4/Tle4 mit Otx2 und eine dadurch bedingte Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von Otx2 zeigen (Puelles et al., 2004; Heimbucher et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen damit im Einklang, da die Ko-Transfektion von *Otx2-Gal4* mit *Grg4/Tle4* zu einer starken Senkung der transkriptionellen Aktivität von Otx2-Gal4 führte. Die Ko-Transfektion von *Meis2HA* zusammen mit *Otx2-Gal4* und *Grg4/Tle4*, führte jedoch zu einer signifikanten Aufhebung der unterdrückten transkriptionellen Aktivität. Dies war jedoch nur dann gegeben, wenn ein Überschuss des *Meis2HA*-exprimierenden Plasmids gegenüber dem *Grg4/Tle4*-Plasmid in die Zellen transfiziert wurde (Diagramm 2). Im Gegensatz dazu, führte *Meis2HA* nicht zur Aufhebung der Grg4/Tle4-bedingten Aktivitätsunterdrückung einer Otx2-Deletionsvariante, welcher die N-terminalen 100 Aminosäuren fehlen (Diagramm 3). Das oben aufgeführte Problem einer möglichen Funktionsuntüchtigkeit des Otx2-Deletionsproteins war hier nicht gegeben, da die DNA-Bindung in diesem Fall über die fusionierte Gal4-DNA-Bindedomäne vermittelt wird und für den nukleären Transport des Proteins ein zusätzliches, nukleäres Lokalisationssignal vorhanden war. Diese Deletion umfasst jedoch die in dieser Arbeit charakterisierte Interaktionsdomäne von Otx2 mit Meis2. Somit kann Meis2 nur dann die transkriptionelle Aktivität von Otx2 wiederherstellen, wenn das Otx2-Protein die zur Bindung an Meis2 notwendige Sequenz enthält. Dieser Befund untermauert somit die Notwendigkeit einer Interaktion von Meis2 mit Otx2 zur Aufhebung der Grg4/Tle4-vermittelten Unterdrückung des Aktivierungspotentials von Otx2.

Diese Ergebnisse weisen also auf einen Mechanismus hin, bei dem Meis2 und der Ko-Repressor Grg4/Tle4 um die Bindung mit Otx2 konkurrieren. Bei Bindung von Meis2 an Otx2 kommt es zur Verdrängung des Ko-Repressors und somit zu einer Aufhebung der Ko-Repressor bedingten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von Otx2.

Die Interaktion von Meis2 und Otx2 ist vermutlich direkt und findet auch in Abwesenheit von DNA statt, wie Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen konnten (Abb. 32). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der hier erläuterten möglichen Funktionsweise von Meis2. Im hier verwendeten Reportersystem besaß lediglich Otx2 eine GAL4-DNA-Bindedomäne, also auch die Möglichkeit an die regulatorischen Elemente des Reporterkonstruktes zu binden. In einer Studie wurde außerdem beschrieben, dass die Homeodo-

mäne der bicoid-Familie, welche der Homeodomäne von Otx2 ähnlich ist, eine dreidimensionale Struktur einnimmt, welche die zwei voneinander getrennten Helix 1 und Helix 3 der Homeodomäne in unmittelbare Nähe zueinander bringt (Baird-Titus et al., 2006; NCBI Struktur MMDB ID#42063). Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, wie Meis2 einen Einfluss auf die Bindung des Grg4/Tle4-Proteins an Otx2 haben könnte, obwohl die beiden Proteine an unterschiedliche Bereiche des Otx2-Proteins binden.

An dieser Stelle wäre es interessant näher zu analysieren, was die unterschiedlichen Proteinsequenzen von Meis2 im Zusammenhang mit der Interaktion von Otx2 bewirken. Denn wie Untersuchungen dieser Arbeit ebenfalls zeigen konnten, sind vermutlich mehrere Sequenzabschnitte des Meis2-Proteins für eine stabile Interaktion mit Otx2 erforderlich (Abb. 31). Diese Annahme stützen Experimente, die zeigten, dass eine Unterdrückung der *ephrinB1*-Expression durch das *Meis2Enr*-Fusionskonstrukt ohne die Homeodomäne von Meis2 zwar überhaupt nicht mehr möglich war. Ohne die N-terminale Domäne von Meis2 konnte jedoch nur eine schwache Unterdrückung festgestellt werden (Abb. 14).

Grg4/Tle4 wird ab HH 8, also noch vor Beginn der *Meis2*-Expression, im mesenzephalischen und dienzephalischen Vesikel exprimiert. Die Expression ist zunächst stark und nimmt im Laufe der Entwicklung ab, bleibt jedoch im Mittelhirn auch in der weiteren Entwicklung sehr schwach aufrechterhalten (Sugiyama et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass Grg4/Tle4 die Induktion tektaler Strukturen hemmt und die Ausbildung einer adäquaten, tektumspezifischen Laminierung stört (Sugiyama et al., 2000; Sugiyama und Nakamura, 2003). Dies steht im Gegensatz zu den bisher gewonnenen Erkenntnissen zur Funktion von Meis2 bei der Entwicklung des optischen Tektums und stützt die Annahme, dass die beiden Proteine miteinander konkurrieren könnten. Im dorsalen Mittelhirn werden *Meis2* und *Grg4/Tle4* unterschiedlich stark exprimiert, mit einer sehr starken Expression von *Meis2* und einer schwachen Expression von *Grg4/Tle4*. Diese Tatsache liefert eine mögliche Erklärung dafür, warum Meis2 in den Reporterexperimenten nur in einem mehr als dreifachen Überschuss in der Lage war, die Grg4/Tle4 vermittelte Unterdrückung der Otx2-Aktivität signifikant aufzuheben. Die Bindung von Grg4/Tle4 an Otx2 ist womöglich stärker als die Bindung von Meis2 an Otx2. Im ventralen Mittelhirn, dort wo Meis2 nicht exprimiert wird, ist hingegen eine starke Expression von Grg4/Tle4 zu finden (z. Bsp. Pue- lles et al., 2003). Dies wäre im Übrigen auch eine weitere Erklärung, neben der Wirkung von Shh als ventralisierendes Signalmolekül, weshalb die *Meis2HA*-Fehlexpression im ventralen Mittelhirn keine Transdifferenzierung des Gewebes auslösen konnte (Abb. 23).

Zusammengefasst ließe sich aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse folgendes Modell für die Rolle von *Meis2* und die zeitliche Abfolge tektaler Spezifizierung aufstellen: Während der Gastrulation spezifiziert *Otx2* den Bereich der zukünftigen anterioren Hirnstrukturen. An der posterioren Grenze der *Otx2*-Expressionsdomäne wird die organisatorische Aktivität des MHO induziert, womit die zukünftige Region des Mittelhirns und des Hinterhirns festgelegt wird. Parallel zur Festlegung der MHR wird *Grg4* zunächst stark im Bereich des zukünftigen Metenzephalons, Mesenzephalons, Dienzephalons und Telenzephalons, ein wenig später nur noch im mesenzephalischen und dienzephalischen Vesikel gebildet (Sugiyama et al., 2000). *Meis2* wird zu diesem Zeitpunkt noch nicht exprimiert. Somit interagiert *Otx2* zu diesem Zeitpunkt mit *Grg4*. Arbeiten von Heimbucher und Kollegen (2007) zeigten, dass die Interaktion von *Otx2* mit *Grg4/Tle4* die Expression von *Fgf8* hemmt. Die Interaktion von *Otx2* mit *Grg4/Tle4* unterstützt somit zu einem durch Hemmung der *Fgf8*-Expression eine korrekte Positionierung des MHO. Außerdem könnte es eine frühzeitige Entwicklung tektaler Strukturen unterdrücken. Im Stadium HH 11-12 kommt es über einen bislang noch ungeklärten Mechanismus anterior des MHO zur Induktion von *Meis2*-Expression, welche sich aufgrund negativer Einflüsse aus dem benachbarten Gewebe, in den dorsalen Alarplatten des mesenzephalischen Vesikels manifestiert. Hier interagiert *Meis2* mit *Otx2*, was zur Verdrängung des Ko-Repressors und damit zu einer Aufhebung der *Grg4/Tle4*-vermittelten Unterdrückung der transkriptionellen Aktivität von *Otx2* führt. Dies würde eine Induktion von Tektumentwicklung zur Folge haben (Abb. 40, 1).

Dieses Modell präsentiert also einen Mechanismus, bei welchem die Spezifizierung bestimmter Gewebe oder Organe über das Wechselspiel spezifisch exprimierter Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren erfolgt, die mit unspezifisch exprimierten Regulatoren interagieren. Für die Entwicklung anteriorer Hirnstrukturen wurde ein derartiger Mechanismus noch nicht beschrieben. Dennoch gibt es Untersuchungen, die einen ähnlichen Mechanismus einer konkurrierenden Bindung von Ko-Repressoren der *Grg/Tle*-Familie und Ko-Aktivatoren beschreiben konnten. So wurde nukleäres β -Catenin bereits in mehreren Studien als Ko-Aktivator beschrieben, welcher einen *Grg*-vermittelten Repressorkomplex durch Verdrängung des Ko-Repressors ummoduliert, so dass die Aktivierung bestimmter Gene, beispielsweise Zielgene des Wnt-Signalweges, erfolgen kann (Daniels und Weis, 2005; Lang et al., 2005; Range et al., 2005).

Wenn man sich nun die Vorgänge in der Zelle vorstellt, scheint die Übertragung dieses Modells auf spätere Entwicklungsstadien jedoch zunächst schwierig. Wie können bei Anwesenheit aller Komponenten, also Meis2, Otx2 und Grg4/Tle4, in der gleichen Zelle repressorische und aktivierende Transkriptionskomplexe gleichzeitig existieren? Vielleicht ließe sich hier die Funktion von TALE-Homeodomänenproteinen als so genannte „Pioniertranskriptionsfaktoren“ auf dieses Problem übertragen. Dieser Mechanismus für Meis- und Pbx-Proteine wurde zuerst bei der Muskelzelldifferenzierung beschrieben (Berkes et al., 2004). Bei dieser Theorie sind Meis- und Pbx-Proteine bereits vor Aktivierung eines bestimmten Zielgens an den regulatorischen Sequenzen dieser Gene und sorgen durch Veränderungen der Chromatinstruktur für die adäquate Vorbereitung der DNA auf den Transkriptionsstart. Sobald der Hauptregulator der Transkription, in diesem Fall wäre es Otx2, dazukommt, wird die Transkription des Zielgens aktiviert. Normalerweise hemmt Otx2 im Verbund mit Grg4/Tle4 die Transkription bestimmter Gene. An den regulatorischen Elementen, an welchen Meis2 nicht vorhanden ist, kommt es also zu einer Unterdrückung der Transkription. An den zu aktivierenden regulatorischen Sequenzen ist Meis2 jedoch vorhanden. Bei Bindung eines Grg4/Otx2-Komplexes an diese zuvor „gezeichneten“ regulatorischen Sequenzen, kommt es durch Meis2 zur Verdrängung von Grg4/Tle4 aus dem Komplex, wodurch die Transkription des Gens aktiviert wird. Dieses Modell erlaubt also die Aktivierung und Unterdrückung von Genexpression mittels eines einzigen Regulators, zur gleichen Zeit und am gleichen Ort, nämlich über die Modulation seiner Aktivität durch Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren (Abb. 40, 2).

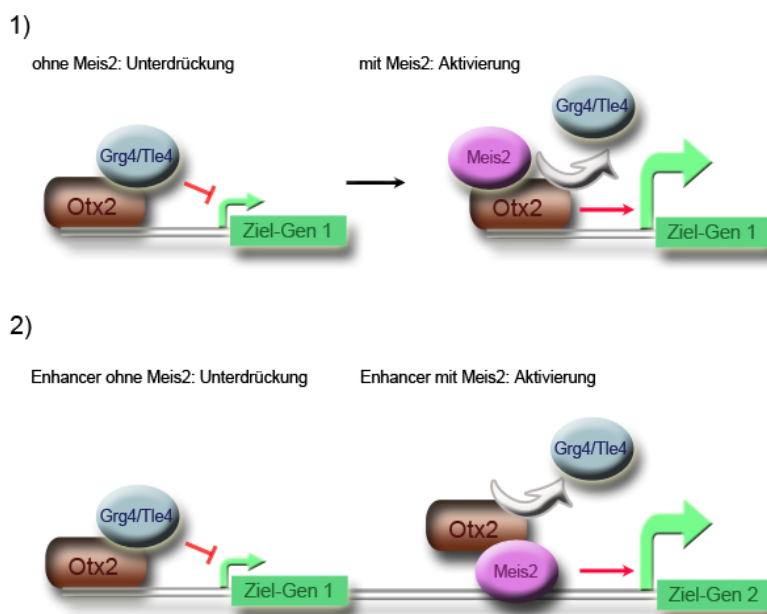


Abbildung 40: Modelle zur möglichen Funktionsweise von Meis2 bei der Entwicklung des Tektums. 1) Otx2/Tle4 Komplexe führen zur Unterdrückung eines Zielgens. Kommt Meis2 hinzu, so wird Grg4/Tle4 verdrängt, und es kommt zur Aktivierung des Zielgens. 2) Erweitertes Modell: Meis2 besetzt bestimmte tektum-spezifische „Enhancer“. Dort wo kein Meis2 ist, lagert sich der Otx2/Tle4-Komplex an und die Transkription wird unterdrückt. An „Enhancern“ die durch Meis2 „markiert“ worden sind, kommt es zur Verdrängung von Grg4/Tle4, und die Transkription wird aktiviert.

Biochemische Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten auch eine Interaktion von Meis2 mit Pax3 und Pax7 im Mittelhirn des Hühnchens (Abb. 35). Eine Interaktion mit Grg4/Tle4 und eine dadurch bedingte repressorische Aktivität wurde auch für diese Proteine beschrieben (Muhr et al., 2001; Lang et al., 2005). Da diesen Proteinen eigentlich tektumfördernde Funktionen zugesprochen werden, ist es durchaus vorstellbar, dass auch hier eine Grg4/Tle4-vermittelte Unterdrückung ihrer Aktivität erst durch die Anwesenheit von Meis2 aufgehoben wird, wodurch diese Proteine erst in Kooperation mit Meis2 ihren Beitrag zur Tektumentwicklung leisten könnten (Matsunaga et al., 2001). Interessant wäre an dieser Stelle ein Aufschluss darüber, ob es sich hierbei um andere, Otx2-unabhängige Komplexe handelt oder ob hier ein hochmolekularer Transkriptionskomplex vorliegt, dem neben Meis2 und Otx2 auch Pax3/7 angehören. Es konnte ebenfalls eine Interaktion von Grg4/Tle4 mit anderen Pax-Proteinen der MHR, Pax2/5/8, gezeigt werden (Eberhard et al., 2000). Auch Engrailed-Proteine besitzen eine Eh1-Domäne, die eine Interaktion zu Grg4 vermitteln kann (Heimbucher et al., 2007). Somit könnte die hier beschriebene Funktion von Meis2, die Aufhebung Grg4/Tle4-vermittelter transkriptioneller Unterdrückung, ein allgemeiner Mechanismus zur Induktion tektaler Strukturen sein.

Wie aus den hier erläuterten Modellen jedoch deutlich wird, ist es in Zukunft unumgänglich Zielgene des Otx2/Meis2-Komplexes zu identifizieren. Methoden, wie beispielsweise ChIP³ und EMSA⁴, könnten die Möglichkeiten bieten, die hier aufgestellten Modelle zu testen und das Bild der hier beschriebenen Mechanismen zu vervollständigen.

Es ist anzunehmen, dass Meis2/Otx2-Komplexe viele Zielgene haben. Mögliche gemeinsame Zielgene könnten beispielsweise das Transmembranmolekül *ephrinB1* oder der Transkriptionsfaktor *Dbx1* sein. Wie bereits erläutert, reguliert Meis2 im Mittelhirn *ephrinB1* (Kapitel 3.3.3) und die *Dbx1*-Expression (Abb. 17). Meis2 könnte auch die Proliferation tektaler Vorläuferzellen steuern - die relative Größe im Vergleich zu anderen Hirnstrukturen im Hühnchen ist das auffälligste Attribut des optischen Tektums. Wie gezeigt werden konnte, reguliert Meis2 die Expression der Zellzykluskomponente *cyclinD1* (Bobak, Diplomarbeit 2008). Ein Zusammenhang von Meis2 mit Proliferation wurde ebenfalls bereits beschrieben (Heine et al., 2008). Allerdings lässt sich aufgrund der hier durchgeführten Experimente nicht sagen, ob diese Gene direkte oder indirekte Zielgene von Meis2 sind. Es wurden bislang noch keine regulatorischen Sequenzen des

³ ChIP: Chromatin-Immunopräzipitation

⁴ EMSA: Electromobility Shift Assay (engl.)

ephrinB1-Gens beschrieben. Es ist bekannt, dass Otx2 die *ephrinA2*-Expression induziert, einen weiteren Vertreter aus der Familie der Ephrine (Rhinn et al., 1999). Es wäre also durchaus vorstellbar, dass Otx2 auch die *ephrinB1*-Expression reguliert.

Das ephrinB1-Protein ist im Bezug auf die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit jedoch in sofern ein interessantes Molekül als dass es ein transmembranes Protein ist, welcher Zell-Zelladhäsionen vermittelt und früh in der Entwicklung im Mittelhirn exprimiert wird (Braisted et al., 1997, z. Bsp. Lee et al., 2008). Diese Tatsache könnte die direkte Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, *Meis2EnR*-bedingten, Entwicklungsstörungen des Tektums liefern (Abb. 10, 11). Die Überexpression von *Meis2EnR* führte ebenfalls zu einer Unterdrückung von *ephrinB1* im Mittelhirn (Abb. 13). Eine Beteiligung von Ephrinen beispielsweise an der Faszikulierung von Axonen konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Caras, 1997; Muhleisen et al., 2006). Auch spätere Aspekte, wie zum Beispiel die Laminierung des optischen Tektums, könnten durch Zell-Zelladhäsionsvorgänge über ephrinB1 vermittelt werden. Die hier beobachteten strukturellen Störungen in der Tektumentwicklung, wie eine Störung der Axonfaszikulierung oder der tektalen Laminierung, könnten also auf den *Meis2EnR*-bedingten Verlust des Transmembranproteins ephrinB1 zurückgeführt werden.

Zell-Zelladhäsionen sind für Zellsortierungs- bzw. Zellsegregationsvorgänge von Bedeutung. Diese Vorgänge tragen wiederum dazu bei, dass sich verschiedene Gruppen von Zellen gegeneinander abgrenzen und damit Grenzzonen gebildet werden, die ein überschreiten der Zellen in andere Regionen verhindern. Dies ermöglicht die Differenzierung unterschiedlicher Kompartimente im Embryo und könnte auch ein bedeutender Vorgang bei der Spezifizierung des optischen Tektums sein (Pasini und Wilkinson, 2002). Die Bedeutung von ephrinB1 für Zellsortierungs- und Zellmigrationsereignisse konnte bereits anhand der Spezifizierung retinaler Vorläuferzellen bei der Augenentwicklung gezeigt werden (Moore et al., 2004; Lee et al., 2006).

4.4 Meis2 kann in der Augenanlage mit Pax6 interagieren

Experimente mit dem Meis2-GST-Fusionsprotein zeigten, dass Meis2 in den Augenanlagen des Hühnchens mit Pax6 interagieren kann (Abb. 36). Somit konnte in der vorliegenden Arbeit ein weiterer Interaktionspartner von Meis2 im anterioren Neuralrohr identifiziert werden. Dieses Ergebnis legt zusammen mit den zuvor schon erläuterten Befunden die Vermutung nahe, dass Pax-Proteine generelle Interaktionspartner von Meis2 sein könnten. Weiterführende Experimente zeigten, dass die Interaktion von Meis2 mit Pax6 direkt und DNA-unabhängig stattfinden kann (Abb. 36C). Überdies wird diese Interaktion vermutlich über die Homeodomäne von Meis2 vermittelt, denn eine starke Interaktion konnte auch mit einem Fusionsprotein ohne den N-terminalen Anteil der Aminosäuren 1 – 198 von Meis2 beobachtet werden (Abb. 36B). Dies steht in Kontrast zu der in dieser Arbeit beschriebenen Interaktion von Meis2 und Otx2. Hier wurde gezeigt, dass beide Anteile des Meis2-Proteins für eine stabile Interaktion benötigt werden (Abb. 31). Für die Interaktion mit Pax7 schienen ebenfalls beide Proteinsequenzen des Meis2-Proteins erforderlich zu sein (Abb. 35). Dieser Unterschied in der Bindungsart von Meis2 und zwei Vertretern der gleichen Proteinfamilie könnte auf kontextspezifische Modulationen der Interaktion hinweisen. Die Peptidsequenz des Pax6-Proteins, die die Interaktion mit Meis2 vermittelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher charakterisiert. Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wurden bereits sowohl für die Paired-Domäne als auch für die Homeodomäne von Pax6 beschrieben (Mikkola et al., 2001; Planque et al., 2001; Kamachi et al., 2001; Leconte et al., 2004). Bemerkenswert war, dass der für die Immundetektion von Pax6 eingesetzte monoklonale Antikörper (Engelkamp et al., 1999) in den Zelllysaten stets drei weitere starke Banden bei ca. 38 kDa, 35 kDa und 33 kDa erkannte, welche durch das Meis2-GST Protein ebenfalls stark präzipitiert wurden (z. Bsp. Abb. 36A, In). Das Volllängenprotein war bei 48 kDa zu sehen. Die drei bekanntesten Isoformen von Pax6 sind die kanonische Form, die Isoform Pax6-5a, welche eine Insertion von 14 Aminosäuren in ihrer Paired-Domäne besitzt und eine Isoform die keine Paired-Domäne besitzt die *paired-less*-Isoform (Walther et al., 1991; Carriere et al., 1993). In der Wachtelretina konnten bislang fünf Pax6-Isoformen mit einer Größe von 48, 46, 43, 33 und 32 kDa identifiziert werden. Dabei sind die Proteine bei 33 und 32 kDa Paired-Domänen-lose Isoformen (Carriere et al., 1993). Da der monoklonale Antikörper die Paired-Domäne erkennt, ist davon auszugehen, dass es sich bei den kleineren Formen nicht um die *paired-less*-Isoformen handelt. Die kanonische Pax6-Isoform hat eine Größe

von 46 kDa, Pax6-5a läuft bei 48 kDa. Der monoklonale AK gegen Pax6 zeigte in diesem Größenbereich lediglich eine Bande bei 48 kDa in zellulären Lysaten der Hühnenaugenanlagen. Diese Größe würde für die Isoform Pax6-5a sprechen. In den *in vitro*-Experimenten wurde die kanonische Pax6-Isoform verwendet. Diese Isoform präzipitierte ebenfalls mit Meis2-GST (Abb. 36C). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die 14 Aminosäuren der 5a-Insertion für die Interaktion mit Meis2 nicht benötigt werden.

Eine Interaktion von Meis2 und Pax6 könnte die Vermutung bestätigen, dass zumindest in der Retina, beide Proteine in einem Komplex die Expression von Pax6 regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass Meis-Proteine direkt die Pax6-spezifischen „Enhancer“ der Linse und der Bauchspeicheldrüse regulieren (Zhang et al., 2002; Zhang et al., 2006). Arbeiten im Labor von Frau PD Dr. Schulte zeigten eine Meis1- und Meis2-abhängige Aktivierung des Retina-spezifischen „ α -Enhancers“ von Pax6. Dabei konnte diese Aktivierung durch Ko-Transfektion mit Pax6, im Einklang mit zuvor beschriebener Autoregulation von Pax6, noch gesteigert werden (Heine et al., 2008). Somit wäre es also möglich, dass die Regulation der Pax6-Expression in der Retina über einen Komplex mit Pax6 selbst und Meis2 erfolgt.

Pax6 gilt als „*master control gene*“ der Augentwicklung und übt vielfältige Funktionen in der Spezifizierung der Linse und der Retina aus (Ashery-Padan und Gruss, 2001). Pax6 und Meis2 werden in mehreren Regionen der Augenanlage ko-exprimiert und entfalten dort zum Teil auch ähnliche Funktionen (Heine et al., 2008). In der Anlage der Retina sind beispielsweise beide Proteine an der Regulation der Proliferation retinaler Vorläuferzellen beteiligt und sind Bestandteil des regulatorischen Netzwerkes der Augenentwicklung (Ashery-Padan und Gruss, 2001; Heine et al., 2008). Es ist also durchaus vorstellbar, dass Meis2 und Pax6 diese Funktionen als Komplex ausüben. Die Augenspezifizierung und -entwicklung wird über eine Reihe von Transkriptionsfaktoren den so genannten „*eye field*“ Transkriptionsfaktoren (EFTFs), gesteuert. Hierzu gehören neben Pax6 die Transkriptionsfaktoren Six3, Six6 (Optx2), Lhx2, Rx1 und Chx10 (Ashery-Padan und Gruss, 2001; Zuber et al., 2003). Erste vorläufige, hier nicht aufgeführte Untersuchungen im Rahmen meiner Doktorarbeit gaben Hinweise auf eine mögliche Interaktion von sowohl Six3 als auch Chx10 mit Meis2. Somit könnte Meis2 auch bei der Entwicklung des Auges, entsprechend seiner Funktion als Ko-Transkriptionsfaktor, eine generelle Rolle einnehmen. Interessanterweise konnte eine entwicklungsrelevante Grg-vermittelte Unterdrückung transkriptioneller Aktivität auch ebenfalls für das Six3-Protein in der Augenanlage gezeigt werden

(Zhu et al., 2002). Im Gegensatz dazu hat Pax6 keine Eh1-Domäne und kann daher auch nicht mit Grg-Proteinen interagieren (Muhr et al., 2001). Dies weist darauf hin, dass die funktionelle Relevanz der Interaktion von Meis2 mit Pax6 auf einem anderen Mechanismus als die Interaktion von Meis2 mit Otx2 beruht.

4.5 Meis2 kann in der Augenanlage mit dem Enzym Parp-1 interagieren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein weiterer möglicher Interaktionspartner von Meis2 identifiziert werden. Die massenspektrometrische Analyse einer dominanten Bande bei ungefähr 110 kDa, die nach einem Experiment mit Meis2-GST, nicht aber mit GST alleine aus Augenanlagen von E 2,5 Hühnchen, zu beobachten war, identifizierte die Proteinbande als das Enzym Parp-1 (Poly-(ADP-ribose) Polymerase 1; Abb. 37). Eine Analyse der gleichen Proteinprobe mittels des sensitiveren Tandem-Massenspektrometrie Verfahrens konnte diesen Befund untermauern. Da dieser Versuch lediglich einmal durchgeführt wurde, bedarf es einer Verifizierung dieses Ergebnisses durch eine Wiederholung des Versuchs. Die hier beobachtete prominente Bande bei ca. 110 kDa konnte jedoch auch in einem weiteren Experiment aus den Augenanlagen von Hühnchen nach einer Silberfärbung des Gels beobachtet werden, sie wurde jedoch nicht einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen.

Die Analyse von Proteinlysaten durch SDS-PAGE und anschließendem Western Transfer, zeigte, dass Parp-1 sowohl in den Augenanlagen als auch in der Tektumanlage von E 2,5 Hühnchen exprimiert wird (Abb. 38). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass Parp-1 auch im Mittelhirn mit Meis2 interagiert. In beiden Geweben war sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Fraktion eine prominente Bande bei etwa 100 kDa zu sehen. Dies widerspricht den Angaben des Antikörperdatenblatts (Biospan Lifescience) und auch eines anhand der Sequenz errechneten Molekulargewichts des Proteins von 113,62 kDa⁵. Je nach Ladung und Polarität eines Proteins kann es in Abhängigkeit des pH-Wertes im Gelsystem zu unterschiedlichen Laufverhalten der Proteine kommen. So wäre es möglich, dass das Enzym Parp-1 aufgrund seiner Beschaffenheit bei einem pH-Wert von 8,1 im Tris-Acetat Gelsystem chemischen Modifikationen unterliegt und somit nur bei einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa erscheint. Bemerkenswerterweise war in beiden Geweben in der zytoplasmatischen Fraktion zusätzlich eine zweite Bande bei ca. 80 kDa zu sehen (Abb.

⁵ <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>

38, Zyt.). Parp-1 wurde als nukleäres Protein zunächst im Zusammenhang mit programmiertem Zelltod (Apoptose) und DNA-Reparatur entdeckt. Im Laufe der Apoptose kommt es zu einer enzymatischen Spaltung von Parp-1 in ein 89 kDa und ein 24 kDa großes Fragment, was weitgehend zur Inaktivierung des Proteins führt und so die DNA-Reparatur verhindert (Soldani und Scovassi, 2002). Dies ist ein nukleärer Prozess, was einen Widerspruch zu dem Befund dargestellt, dass die zweite Parp-1-Form nur im Zytoplasma nachgewiesen wurde. Außerdem war in der zytoplasmatischen Fraktion das Vollängen-Parp-1 Protein ebenfalls vorhanden. Das hier analysierte Proteinlysate ist ein Proteingemisch aus zahlreichen Zellen. Es wäre also eine Möglichkeit, dass die beiden Formen des Proteins in unterschiedlichen Zellen der Augenanlage exprimiert werden. Die zweite Bande könnte jedoch auch ein unspezifisches Degradationsprodukt darstellen, oder eine weitere bislang noch nicht beschriebene Isoform des Enzyms sein. Die Tatsache, dass das Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus nachzuweisen war, ist bemerkenswert, da Parp-1 bisher als nukleäres Protein beschrieben wurde.

Parp-1 ist ein stark exprimiertes, weit verbreitetes Enzym und katalysiert die posttranslationale Anheftung von ADP-Resten an Proteine. Parp-1-Aktivität erhöht sich drastisch bei DNA-Schädigung. Jüngste Studien zeigten jedoch, dass die Hintergrundaktivität des Enzyms auch wichtige, integrative Funktionen bei der Genregulation in der Embryogenese bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen einnimmt. Das Enzym interagiert mit DNA und besetzt zahlreiche regulatorische Elemente von Genen. Parp-1 wurden bereits Funktionen bei der Chromatin-Modifikation und als Ko-Faktor von transkriptionellen Regulatoren, sowohl im Zusammenhang mit Transkriptionsunterdrückung als auch –aktivierung zugesprochen (Kraus, 2008). Eine Studie konnte beispielsweise einen Parp-1-bedingten Austausch von Ko-Repressoren gegen Ko-Aktivatoren in einem Groucho-abhängigen Repressorkomplex zur Induktion neuronaler Differenzierung beschreiben (Ju et al., 2004). Interessanterweise konnte für Parp-1 ebenfalls eine Rolle bei der Regulation retina-spezifischer *Pax6*-Expression in der Wachtel zugesprochen werden (Plaza et al., 1999).

Die Parp-1 bedingte Poly-Adenylierung von Proteinen ermöglicht eine Vielfalt an Modulationen von Genexpression und -regulation. Eine hier beschriebene mögliche Interaktion von Meis2 mit Parp-1 eröffnet eine große Anzahl an interessanten Möglichkeiten für die funktionelle Relevanz dieser Interaktion.

5. Literaturverzeichnis

- Acampora,D., Gulisano,M., Broccoli,V., and Simeone,A.** (2001). Otx genes in brain morphogenesis. *Progress in Neurobiology* **64**, 69-95.
- Acampora,D., Mazan,S., Lallemand,Y., Avantaggiato,V., Maury,M., Simeone,A., and Brulet,P.** (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx2-/- mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* **121**, 3279-3290.
- Agoston, Z.** (2005). Die Rolle von Meis1 und Meis2 bei der Frühentwicklung des ZNS der Wirbeltiere. Diplomarbeit, Frankfurt am Main.
- Ahsan,M., Riley,K.L., and Schubert,F.R.** (2007). Molecular mechanisms in the formation of the medial longitudinal fascicle. *Journal of Anatomy* **211**, 177-187.
- Ang,S.L., Jin,O., Rhinn,M., Daigle,N., Stevenson,L., and Rossant,J.** (1996). A targeted mouse Otx2 mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* **122**, 243-252.
- Araki,I. and Nakamura,H.** (1999). Engrailed defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate. *Development* **126**, 5127-5135.
- Ashery-Padan,R. and Gruss,P.** (2001). Pax6 lights-up the way for eye development. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 706-714.
- Ausubel, F.M., Brent R., Kinston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl K.** (1998). Current Protocols in Molecular Biology.
- Badde,A. and Schulte,D.** (2008). A role for receptor protein tyrosine phosphatase lambda in mid-brain development. *J. Neurosci.* **28**, 6152-6164.
- Baird-Titus,J.M., Clark-Baldwin,K., Dave,V., Caperelli,C.A., Ma,J., and Rance,M.** (2006). The solution structure of the native K50 Bicoid homeodomain bound to the consensus TAATCC DNA-binding site. *J. Mol. Biol.* **356**, 1137-1151.
- Bally-Cuif,L., Alvarado-Mallart,R.M., Darnell,D.K., and Wassef,M.** (1992). Relationship between Wnt-1 and En-2 expression domains during early development of normal and ectopic met-mesencephalon. *Development* **115**, 999-1009.
- Ben Arie,N., Bellen,H.J., Armstrong,D.L., McCall,A.E., Gordadze,P.R., Guo,Q., Matzuk,M.M., and Zoghbi,H.Y.** (1997). Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* **390**, 169-172.
- Berkes,C.A., Bergstrom,D.A., Penn,B.H., Seaver,K.J., Knoepfler,P.S., and Tapscott,S.J.** (2004). Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Mol. Cell* **14**, 465-477.
- Berthelsen,J., Zappavigna,V., Ferretti,E., Mavilio,F., and Blasi,F.** (1998). The novel homeo-protein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *Embo Journal* **17**, 1434-1445.
- Bessa,J., Tavares,M.J., Santos,J., Kikuta,H., Laplante,M., Becker,T.S., Gomez-Skarmeta,-J.L., and Casares,F.** (2008). meis1 regulates cyclin D1 and c-myc expression, and controls

- the proliferation of the multipotent cells in the early developing zebrafish eye. *Development* **135**, 799-803.
- Bobak, N.** (2008). Die Rolle der TALE-Homeodomänproteine Meis1 und Meis2 bei der Entwicklung des Zentralnervensystems. Diplomarbeit, Mainz.
- Bobak N., Agoston Z., Schulte D.** (2009) Evidence against involvement of Bmp Receptor 1b signaling in fate specification of the chick mesencephalic alar plate after the 9-10 somite stage. *Neuroscience Letters*, in Revision.
- Braisted, J.E., McLaughlin, T., Wang, H.U., Friedman, G.C., Anderson, D.J., and O'Leary, D.D.** (1997). Graded and lamina-specific distributions of ligands of EphB receptor tyrosine kinases in the developing retinotectal system. *Dev. Biol.* **191**, 14-28.
- Brand, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Beuchle, D., Lun, K., FurutaniSeiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D.A. et al.** (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* **123**, 179-190.
- Broccoli, V., Boncinelli, E., and Wurst, W.** (1999). The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmus organizer. *Nature* **401**, 164-168.
- Buckingham, M. and Relaix, F.** (2007). The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**, 645-673.
- Burglin, T.R.** (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4173-4180.
- Calvo, K.R., Knoepfler, P.S., Sykes, D.B., Pasillas, M.P., and Kamps, M.P.** (2001). Meis1a suppresses differentiation by G-CSF and promotes proliferation by SCF: Potential mechanisms of cooperativity with Hoxa9 in myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13120-13125.
- Camus, A., Davidson, B.P., Billiards, S., Khoo, P.L., Rivera-Perez, J.A., Wakamiya, M., Behringer, R.R., and Tam, P.P.L.** (2000). The morphogenetic role of midline mesendoderm and ectoderm in the development of the forebrain and the midbrain of the mouse embryo. *Development* **127**, 1799-1813.
- Capdevila, J., Tsukui, T., Rodriguez, E.C., Zappavigna, V., and Izpisua Belmonte, J.C.** (1999). Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor Meis2 and distal antagonism of BMPs by Gremlin. *Mol. Cell* **4**, 839-849.
- Caras, I.W.** (1997). A link between axon guidance and axon fasciculation suggested by studies of the tyrosine kinase receptor EphA5/REK7 and its ligand Ephrin-A5/AL-1. *Cell and Tissue Research* **290**, 261-264.
- Carriere, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Bailly, M., Stehelin, D., and Saule, S.** (1993). Characterization of Quail Pax-6 (Pax-Qnr) Proteins Expressed in the Neuroretina. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 7257-7266.
- Chambers, D., Wilson, L., Maden, M., and Lumsden, A.** (2007). RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. *Development* **134**, 1369-1383.

- Chang,C.P., Jacobs,Y., Nakamura,T., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., and Cleary,M.L.** (1997). Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5679-5687.
- Choe,S.K. and Sagerstrom,C.G.** (2005). Variable Meis-dependence among paralog group-1 Hox proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **331**, 1384-1391.
- Choe,S.K., Vlachakis,N., and Sagerstrom,C.G.** (2002). Meis family proteins are required for hindbrain development in the zebrafish. *Development* **129**, 585-595.
- Chow,R.L., Altmann,C.R., Lang,R.A., and Hemmati-Brivanlou,A.** (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* **126**, 4213-4222.
- Crossley,P.H., Martinez,S., and Martin,G.R.** (1996). Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* **380**, 66-68.
- Crossley,P.H., Martinez,S., Ohkubo,Y., and Rubenstein,J.L.R.** (2001). Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* **108**, 183-206.
- Danielian,P.S. and McMahon,A.P.** (1996). Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development. *Nature* **383**, 332-334.
- Daniels,D.L. and Weis,W.I.** (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 364-371.
- Danno,H., Michiue,T., Hitachi,K., Yukita,A., Ishiura,S., and Asashima,M.** (2008). Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5408-5413.
- Dibner,C., Elias,S., and Frank,D.** (2001). XMeis3 protein activity is required for proper hindbrain patterning in *Xenopus laevis* embryos. *Development* **128**, 3415-3426.
- Eberhard,D., Jimenez,G., Heavey,B., and Busslinger,M.** (2000). Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. *EMBO J.* **19**, 2292-2303.
- Engelkamp,D., Rashbass,P., Seawright,A., and van,H., V** (1999). Role of Pax6 in development of the cerebellar system. *Development* **126**, 3585-3596.
- Fedtsova,N., Quina,L.A., Wang,S.R., and Turner,E.E.** (2008). Regulation of the development of tectal neurons and their projections by transcription factors Brn3a and Pax7. *Developmental Biology* **316**, 6-20.
- Finkelstein,R. and Perrimon,N.** (1990). The orthodenticle gene is regulated by bicoid and torso and specifies *Drosophila* head development. *Nature* **346**, 485-488.
- Fossat,N., Chatelain,G., Brun,G., and Lamonerie,T.** (2006). Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep.* **7**, 824-830.
- Freemantle,S.J., Kerley,J.S., Olsen,S.L., Gross,R.H., and Spinella,M.J.** (2002). Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma. *Oncogene* **21**, 2880-2889.

- Funahashi,J., Okafuji,T., Ohuchi,H., Noji,S., Tanaka,H., and Nakamura,H.** (1999). Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Dev. Growth Differ.* **41**, 59-72.
- Garda,A.L., Echevarria,D., and Martinez,S.** (2001). Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmus organizer. *Mechanisms of Development* **101**, 111-118.
- Gershon,A.A., Rudnick,J., Kalam,L., and Zimmerman,K.** (2000). The homeodomain-containing gene Xdbx inhibits neuronal differentiation in the developing embryo. *Development* **127**, 2945-2954.
- Glaser,T., Walton,D.S., and Maas,R.L.** (1992). Genomic Structure, Evolutionary Conservation and Aniridia Mutations in the Human Pax6 Gene. *Nature Genetics* **2**, 232-239.
- Halder,G., Callaerts,P., and Gehring,W.J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science* **267**, 1788-1792.
- Hamburger,V. and Hamilton,H.L.** (1951). A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. *Journal of Morphology* **88**, 49-&.
- Hanks,M., Wurst,W., Ansoncartwright,L., Auerbach,A.B., and Joyner,A.L.** (1995). Rescue of the En-1 Mutant Phenotype by Replacement of En-1 with En-2. *Science* **269**, 679-682.
- Heimbucher,T., Murko,C., Bajoghli,B., Aghaallaei,N., Huber,A., Stebegg,R., Eberhard,D., Fink,M., Simeone,A., and Czerny,T.** (2007). Gbx2 and Otx2 interact with the WD40 domain of Groucho/Tle corepressors. *Mol. Cell Biol.* **27**, 340-351.
- Heine,P., Dohle,E., Bumsted-O'Brien,K., Engelkamp,D., and Schulte,D.** (2008). Evidence for an evolutionary conserved role of homothorax/Meis1/2 during vertebrate retina development. *Development* **135**, 805-811.
- Hidalgo-Sanchez,M., Millet,S., Bloch-Gallego,E., and Alvarado-Mallart,R.M.** (2005). Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: the Otx2/Gbx2 boundary. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **49**, 134-149.
- Hill,R.E., Favor,J., Hogan,B.L., Ton,C.C., Saunders,G.F., Hanson,I.M., Prosser,J., Jordan,T., Hastie,N.D., and van,H., V** (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **354**, 522-525.
- Hindges,R., McLaughlin,T., Genoud,N., Henkemeyer,M., and O'Leary,D.D.** (2002). EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* **35**, 475-487.
- Hirth,F. and Reichert,H.** (1999). Conserved genetic programs in insect and mammalian brain development. *Bioessays* **21**, 677-684.
- Hisa,T., Spence,S.E., Rachel,R.A., Fujita,M., Nakamura,T., Ward,J.M., Devor-Henneman,D.E., Saiki,Y., Kutsuna,H., Tessarollo,L. et al.** (2004). Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J.* **23**, 450-459.
- Hjorth,J.T., Connor,R.M., and Key,B.** (2002). Role of hlxl in zebrafish brain morphogenesis. *International Journal of Developmental Biology* **46**, 583-596.
- Huang,H., Rastegar,M., Bodner,C., Goh,S.L., Rambaldi,I., and Featherstone,M.** (2005). MEIS C termini harbor transcriptional activation domains that respond to cell signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 10119-10127.

- Inbal,A., Halachmi,N., Dibner,C., Frank,D., and Salzberg,A.** (2001). Genetic evidence for the transcriptional-activating function of Homothorax during adult fly development. *Development* **128**, 3405-3413.
- Inoue,H., Nojima,H., and Okayama,H.** (1990). High-Efficiency Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jacobs,Y., Schnabel,C.A., and Cleary,M.L.** (1999). Trimeric association of hox and TALE homeodomain proteins mediates Hoxb2 hindbrain enhancer activity. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 5134-5142.
- Jainchil, J.L., Aaronson,S.A., and Todaro,G.J.** (1969). Murine Sarcoma and Leukemia Viruses - Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. *Journal of Virology* **4**, 549-&.
- Joyner,A.L., Liu,A.M., and Millet,S.** (2000). Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 736-741.
- Ju,B.G., Solum,D., Song,E.J., Lee,K.J., Rose,D.W., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G.** (2004). Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* **119**, 815-829.
- Kamachi,Y., Uchikawa,M., Tanouchi,A., Sekido,R., and Kondoh,H.** (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes & Development* **15**, 1272-1286.
- Kardon, G** (1998). Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* **125**, 4019-4032.
- Katahira,T., Sato,T., Sugiyama,S., Okafuji,T., Araki,I., Funahashi,J., and Nakamura,H.** (2000). Interaction between Otx2 and Gbx2 defines the organizing center for the optic tectum. *Mech. Dev.* **91**, 43-52.
- Kimura,J., Suda,Y., Kurokawa,D., Hossain,Z.M., Nakamura,M., Takahashi,M., Hara,A., and Aizawa,S.** (2005). Emx2 and Pax6 function in cooperation with Otx2 and Otx1 to develop caudal forebrain primordium that includes future archipallium. *Journal of Neuroscience* **25**, 5097-5108.
- Knoepfler,P.S., Bergstrom,D.A., Uetsuki,T., Dac-Korytko,I., Sun,Y.H., Wright,W.E., Tapscott,S.J., and Kamps,M.P.** (1999). A conserved motif N-terminal to the DNA-binding domains of myogenic bHLH transcription factors mediates cooperative DNA binding with pbx-Meis1/Prep1. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3752-3761.
- Kraus,W.L.** (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Current Opinion in Cell Biology* **20**, 294-302.
- Lang,D., Lu,M.M., Huang,L., Engleka,K.A., Zhang,M.Z., Chu,E.Y., Lipner,S., Skoultchi,A., Millar,S.E., and Epstein,J.A.** (2005). Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* **433**, 884-887.
- LaVail,J.H. and Cowan,W.M.** (1971). The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. *Brain Res.* **28**, 391-419.
- Leconte,L., Lecoin,L., Martin,P., and Saule,S.** (2004). Pax6 interacts with cVax and Tbx5 to establish the dorsoventral boundary of the developing eye. *J. Biol. Chem.* **279**, 47272-47277.

- Lee,H.S., Bong,Y.S., Moore,K.B., Soria,K., Moody,S.A., and Daar,I.O.** (2006). Dishevelled mediates ephrinB1 signalling in the eye field through the planar cell polarity pathway. *Nat. Cell Biol.* **8**, 55-63.
- Lee,H.S., Nishanian,T.G., Mood,K., Bong,Y.S., and Daar,I.O.** (2008). EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nature Cell Biology* **10**, 979-986.
- Logan,C., Wizenmann,A., Drescher,U., Monschau,B., Bonhoeffer,F., and Lumsden,A.** (1996). Rostral optic tectum acquires caudal characteristics following ectopic engrailed expression. *Curr. Biol.* **6**, 1006-1014.
- Lu,S., Bogarad,L.D., Murtha,M.T., and Ruddle,F.H.** (1992). Expression Pattern of A Murine Homeobox Gene, Dbx, Displays Extreme Spatial Restriction in Embryonic Forebrain and Spinal-Cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8053-8057.
- Maeda,R., Ishimura,A., Mood,K., Park,E.K., Buchberg,A.M., and Daar,I.O.** (2002). Xpbx1b and Xmeis1b play a collaborative role in hindbrain and neural crest gene expression in *Xenopus* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5448-5453.
- Mann,R.S.** (1995). The Specificity of Homeotic Gene-Function. *Bioessays* **17**, 855-863.
- Mann,R.S. and Affolter,M.** (1998). Hox proteins meet more partners. *Current Opinion in Genetics & Development* **8**, 423-429.
- Marklund,M., Sjodal,M., Beehler,B.C., Jessell,T.M., Edlund,T., and Gunhaga,L.** (2004). Retinoic acid signalling specifies intermediate character in the developing telencephalon. *Development* **131**, 4323-4332.
- Martinez,S.** (2001). The isthmus organizer and brain regionalization. *International Journal of Developmental Biology* **45**, 367-371.
- Martinez,S. and Alvarado-Mallart,R.M.** (1990). Expression of the homeobox Chick-en gene in chick/quail chimeras with inverted mes-metencephalic grafts. *Dev. Biol.* **139**, 432-436.
- Martinez,S., Crossley,P.H., Cobos,I., Rubenstein,J.L., and Martin,G.R.** (1999). FGF8 induces formation of an ectopic isthmus organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression. *Development* **126**, 1189-1200.
- Martinez,S., Marin,F., Nieto,M.A., and Puelles,L.** (1995). Induction of Ectopic Engrailed Expression and Fate Change in Avian Rhombomeres - Intersegmental Boundaries As Barriers. *Mechanisms of Development* **51**, 289-303.
- Martinez-Morales,J.R., Signore,M., Acampora,D., Simeone,A., and Bovolenta,P.** (2001). Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* **128**, 2019-2030.
- Matsumoto,K., Nishihara,S., Kamimura,M., Shiraishi,T., Otoguro,T., Uehara,M., Maeda,Y., Ogura,K., Lumsden,A., and Ogura,T.** (2004). The prepattern transcription factor Irx2, a target of the FGF8/MAP kinase cascade, is involved in cerebellum formation. *Nat. Neurosci.* **7**, 605-612.
- Matsunaga,E., Araki,I., and Nakamura,H.** (2000). Pax6 defines the di-mesencephalic boundary by repressing En1 and Pax2. *Development* **127**, 2357-2365.

- Matsunaga,E., Araki,I., and Nakamura,H.** (2001). Role of Pax3/7 in the tectum regionalization. *Development* **128**, 4069-4077.
- Matsuo,I., Kuratani,S., Kimura,C., Takeda,N., and Aizawa,S.** (1995). Mouse Otx2 Functions in the Formation and Patterning of Rostral Head. *Genes & Development* **9**, 2646-2658.
- McLaughlin,T., Hindges,R., Yates,P.A., and O'Leary,D.D.** (2003). Bifunctional action of ephrin-B1 as a repellent and attractant to control bidirectional branch extension in dorsal-ventral retinotopic mapping. *Development* **130**, 2407-2418.
- McLaughlin,T. and O'Leary,D.D.M.** (2005). Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annual Review of Neuroscience* **28**, 327-355.
- McMahon,A.P. and Bradley,A.** (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62**, 1073-1085.
- Mercader,N., Leonardo,E., Azpiazu,N., Serrano,A., Morata,G., Martinez,C., and Torres,M.** (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* **402**, 425-429.
- Mercader,N., Leonardo,E., Piedra,M.E., Martinez,A., Ros,M.A., and Torres,M.** (2000). Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of Meis genes. *Development* **127**, 3961-3970.
- Mercader,N., Tanaka,E.M., and Torres,M.** (2005). Proximodistal identity during vertebrate limb regeneration is regulated by Meis homeodomain proteins. *Development* **132**, 4131-4142.
- Mey,J. and Thanos,S.** (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **32**, 343-379.
- Meyers,E.N., Lewandoski,M., and Martin,G.R.** (1998). An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and FLP-mediated recombination. *Nat. Genet.* **18**, 136-141.
- Mikkola,I., Bruun,J.A., Holm,T., and Johansen,T.** (2001). Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by DNA-independent recruitment of different homeodomain proteins. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 4109-4118.
- Millen,K.J., Wurst,W., Herrup,K., and Joyner,A.L.** (1994). Abnormal Embryonic Cerebellar Development and Patterning of Postnatal Foliation in 2 Mouse Engrailed-2 Mutants. *Development* **120**, 695-706.
- Millet,S., Campbell,K., Epstein,D.J., Losos,K., Harris,E., and Joyner,A.L.** (1999). A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature* **401**, 161-164.
- Minowada,G., Jarvis,L.A., Chi,C.L., Neubuser,A., Sun,X., Hacohen,N., Krasnow,M.A., and Martin,G.R.** (1999). Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signaling and can cause chondrodysplasia when overexpressed. *Development* **126**, 4465-4475.
- Miyagawa,T., Amanuma,H., Kuroiwa,A., and Takeda,H.** (1996). Specification of posterior midbrain region in zebrafish neuroepithelium. *Genes to Cells* **1**, 369-377.
- Molotkova,N., Molotkov,A., and Duester,G.** (2007). Role of retinoic acid during forebrain development begins late when Raldh3 generates retinoic acid in the ventral subventricular zone. *Developmental Biology* **303**, 601-610.

- Momose,T., Tonegawa,A., Takeuchi,J., Ogawa,H., Umesono,K., and Yasuda,K.** (1999). Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Development Growth & Differentiation* **41**, 335-344.
- Moore,K.B., Mood,K., Daar,I.O., and Moody,S.A.** (2004). Morphogenetic movements underlying eye field formation require interactions between the FGF and ephrinB1 signaling pathways. *Developmental Cell* **6**, 55-67.
- Muhleisen,T.W., Agoston,Z., and Schulte,D.** (2006). Retroviral misexpression of cVax disturbs retinal ganglion cell axon fasciculation and intraretinal pathfinding in vivo and guidance of nasal ganglion cell axons in vivo. *Dev. Biol.* **297**, 59-73.
- Muhr,J., Andersson,E., Persson,M., Jessell,T.M., and Ericson,J.** (2001). Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **104**, 861-873.
- Nakamura,H.** (2001a). Regionalisation and acquisition of polarity in the optic tectum. *Progress in Neurobiology* **65**, 473-488.
- Nakamura,H.** (2001b). Regionalization of the optic tectum: combinations of gene expression that define the tectum. *Trends in Neurosciences* **24**, 32-39.
- Nakamura,H., Itasaki,N., and Matsuno,T.** (1994). Rostrocaudal Polarity Formation of Chick Optic Tectum. *International Journal of Developmental Biology* **38**, 281-286.
- Nakamura,H., Katahira,T., Matsunaga,E., and Sato,T.** (2005). Isthmus organizer for midbrain and hindbrain development. *Brain Research Reviews* **49**, 120-126.
- Nedelec,S., Foucher,I., Brunet,I., Bouillot,C., Prochiantz,A., and Trembleau,A.** (2004). Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10815-10820.
- Nomura,T., Kawakami,A., and Fujisawa,H.** (1998). Correlation between tectum formation and expression of two PAX family genes, PAX7 and PAX6, in avian brains. *Development Growth & Differentiation* **40**, 485-495.
- Okafuji,T., Funahashi,J., and Nakamura,H.** (1999). Roles of Pax-2 in initiation of the chick tectal development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **116**, 41-49.
- OuladAbdelghani,M., Chazaud,C., Bouillet,P., Sapin,V., Chambon,P., and Dolle,P.** (1997). Meis2, a novel mouse Pbx-related homeobox gene induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Developmental Dynamics* **210**, 173-183.
- Pasini,A. and Wilkinson,D.G.** (2002). Stabilizing the regionalisation of the developing vertebrate central nervous system. *Bioessays* **24**, 427-438.
- Pierani,A., Moran-Rivard,L., Sunshine,M.J., Littman,D.R., Goulding,M., and Jessell,T.M.** (2001). Control of interneuron fate in the developing spinal cord by the progenitor homeodomain protein Dbx1. *Neuron* **29**, 367-384.
- Planque,N., Leconte,L., Coquelle,F.M., Martin,P., and Saule,S.** (2001). Specific Pax-6/microphthalmia transcription factor interactions involve their DNA-binding domains and inhibit transcriptional properties of both proteins. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 29330-29337.

- Plaza,S., Aumercier,M., Bailly,M., Dozier,C., and Saule,S.** (1999). Involvement of poly(ADP-ribose)-polymerase in the Pax-6 gene regulation in neuroretina. *Oncogene* **18**, 1041-1051.
- Puelles,E., Acampora,D., Lacroix,E., Signore,M., Annino,A., Tuorto,F., Filosa,S., Corte,G., Wurst,W., Ang,S.L. et al.** (2003). Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain. *Nature Neuroscience* **6**, 453-460.
- Puelles,E., Annino,A., Tuorto,F., Usiello,A., Acampora,D., Czerny,T., Brodski,C., Ang,S.L., Wurst,W., and Simeone,A.** (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* **131**, 2037-2048.
- Qiu,M.S., Shimamura,K., Sussel,L., Chen,S., and Rubenstein,J.L.R.** (1998). Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. *Mechanisms of Development* **72**, 77-88.
- Range, R.C., Venuti, J.M., and McClay, D.R.** (2005). LvGroucho and nuclear beta-catenin functionally compete for Tcf binding to influence activation of the endomesoderm gene regulatory network in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* **279**, 252-267.
- Reifers,F., Bohli,H., Walsh,E.C., Crossley,P.H., Stainier,D.Y., and Brand,M.** (1998). Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar (ace) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**, 2381-2395.
- Rhinn,M., Dierich,A., La Meur,M., and Ang,S.L.** (1999). Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. *Development* **126**, 4295-4304.
- Riddle,R.D., Johnson,R.L., Laufer,E., and Tabin,C.** (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**, 1401-1416.
- Sato,T. and Nakamura,H.** (2004). The Fgf8 signal causes cerebellar differentiation by activating the Ras-ERK signaling pathway. *Development* **131**, 4275-4285.
- Schulte,D. and Cepko,C.L.** (2000). Two homeobox genes define the domain of EphA3 expression in the developing chick retina. *Development* **127**, 5033-5045.
- Schulte,D., Furukawa,T., Peters,M.A., Kozak,C.A., and Cepko,C.L.** (1999). Misexpression of the Emx-related homeobox genes cVax and mVax2 ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map. *Neuron* **24**, 541-553.
- Schwarz,M., Alvarez-Bolado,G., Dressler,G., Urbanek,P., Busslinger,M., and Gruss,P.** (1999). Pax2/5 and Pax6 subdivide the early neural tube into three domains. *Mechanisms of Development* **82**, 29-39.
- Schwarz,M., Alvarez-Bolado,G., Urbanek,P., Busslinger,M., and Gruss,P.** (1997). Conserved biological function between Pax-2 and Pax-5 in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14518-14523.
- Shamim,H., Mahmood,R., Logan,C., Doherty,P., Lumsden,A., and Mason,I.** (1999). Sequential roles for Fgf4, En1 and Fgf8 in specification and regionalisation of the midbrain. *Development* **126**, 945-959.
- Shen,W.F., Montgomery,J.C., Rozenfeld,S., Moskow,J.J., Lawrence,H.J., Buchberg,A.M., and Largman,C.** (1997). AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol. Cell Biol.* **17**, 6448-6458.
- Shoji,H., Ito,T., Wakamatsu,Y., Hayasaka,N., Ohsaki,K., Oyanagi,M., Kominami,R., Kondoh,H., and Takahashi,N.** (1996). Regionalized expression of the Dbx family

- homeobox genes in the embryonic CNS of the mouse. *Mechanisms of Development* **56**, 25-39.
- Simeone A., Acampora D., Gulisano M., Stornaiuolo A., Boncinelli E.** (1992). Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain. *Nature* **358**, 687-90
- Soldani,C. and Scovassi,A.I.** (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis* **7**, 321-328.
- Suemori,H., Kadodawa,Y., Goto,K., Araki,I., Kondoh,H., and Nakatsuji,N.** (1990). A mouse embryonic stem cell line showing pluripotency of differentiation in early embryos and ubiquitous beta-galactosidase expression. *Cell Differ. Dev.* **29**, 181-186.
- Sugiyama,S., Funahashi,J., Kitajewski,J., and Nakamura,H.** (1998). Crossregulation between En-2 and Wnt-1 in chick tectal development. *Development Growth & Differentiation* **40**, 157-166.
- Sugiyama,S., Funahashi,J., and Nakamura,H.** (2000). Antagonizing activity of chick Grg4 against tectum-organizing activity. *Dev. Biol.* **221**, 168-180.
- Sugiyama,S. and Nakamura,H.** (2003). The role of Grg4 in tectal laminar formation. *Development* **130**, 451-462.
- Suzuki-Hirano,A., Sato,T., and Nakamura,H.** (2005). Regulation of isthmus Fgf8 signal by sprouty2. *Development* **132**, 257-265.
- Thomas,M., Lazic,S., Beazley,L., and Ziman,M.** (2004). Expression profiles suggest a role for Pax7 in the establishment of tectal polarity and map refinement. *Exp. Brain Res.* **156**, 263-273.
- Thompson,J.A., Zembrzycki,A., Mansouri,A., and Ziman,M.** (2008). Pax7 is requisite for maintenance of a subpopulation of superior collicular neurons and shows a diverging expression pattern to Pax3 during superior collicular development. *Bmc Developmental Biology* **8**.
- Tian,E., Kimura,C., Takeda,N., Aizawa,S., and Matsuo,I.** (2002). Otx2 is required to respond to signals from anterior neural ridge for forebrain specification. *Developmental Biology* **242**, 204-223.
- Urbanek,P., Fetka,I., Meisler,M.H., and Busslinger,M.** (1997). Cooperation of Pax2 and Pax5 in midbrain and cerebellum development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5703-5708.
- Vennemann,A., Agoston,Z., and Schulte,D.** (2008). Differential and dose-dependent regulation of gene expression at the mid-hindbrain boundary by Ras-MAP kinase signaling. *Brain Res.* **1206**, 33-43.
- Vernay,B., Koch,M., Vaccarino,F., Briscoe,J., Simeone,A., Kageyama,R., and Ang,S.L.** (2005). Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *Journal of Neuroscience* **25**, 4856-4867.
- Vershon,A.K.** (1996). Protein interactions of homeodomain proteins. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 392-396.
- Vlachakis,N., Choe,S.K., and Sagerstrom,C.G.** (2001). Meis3 synergizes with Pbx4 and Hoxb1b in promoting hindbrain fates in the zebrafish. *Development* **128**, 1299-1312.

- Vogel-Hopker,A., Momose,T., Rohrer,H., Yasuda,K., Ishihara,L., and Rapaport,D.H.** (2000). Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mechanisms of Development* **94**, 25-36.
- Walther,C., Guenet,J.L., Simon,D., Deutsch,U., Jostes,B., Goulding,M.D., Plachov,D., Balling,R., and Gruss,P.** (1991). Pax - A Murine Multigene Family of Paired Box-Containing Genes. *Genomics* **11**, 424-434.
- Waskiewicz,A.J., Rikhof,H.A., Hernandez,R.E., and Moens,C.B.** (2001a). Zebrafish Meis functions to stabilize Pbx proteins and regulate hindbrain patterning. *Development* **128**, 4139-4151.
- Waskiewicz,A.J., Rikhof,H.A., Popperl,H., and Moens,C.B.** (2001b). Pbx and Meis genes are essential for the specification of rhombomere identity in zebrafish. *Developmental Biology* **235**, 276.
- Watanabe,Y. and Nakamura,H.** (2000). Control of chick tectum territory along dorsoventral axis by Sonic hedgehog. *Development* **127**, 1131-1140.
- Williams,T.M., Williams,M.E., and Innis,J.W.** (2005). Range of HOX/TALE superclass associations and proteins domain requirements for HOXA13 : MEIS interaction. *Developmental Biology* **277**, 457-471.
- Wilson,L. and Maden,M.** (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology* **282**, 1-13.
- Wurst,W., Auerbach,A.B., and Joyner,A.L.** (1994). Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* **120**, 2065-2075.
- Wurst,W. and Bally-Cuif,L.** (2001). Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 99-108.
- Ye,W.L., Bouchard,M., Stone,D., Liu,X.D., Vella,F., Lee,J., Nakamura,H., Ang,S.L., Busslinger,M., and Rosenthal,A.** (2001). Distinct regulators control the expression of the mid-hindbrain organizer signal FGF8. *Nature Neuroscience* **4**, 1175-1181.
- Zhang,X., Friedman,A., Heaney,S., Purcell,P., and Maas,R.L.** (2002). Meis homeoproteins directly regulate Pax6 during vertebrate lens morphogenesis. *Genes Dev.* **16**, 2097-2107.
- Zhang,X., Rowan,S., Yue,Y., Heaney,S., Pan,Y., Brendolan,A., Selleri,L., and Maas,R.L.** (2006). Pax6 is regulated by Meis and Pbx homeoproteins during pancreatic development. *Dev. Biol.* **300**, 748-757.
- Zhu,C.Q.C., Dyer,M.A., Uchikawa,M., Kondoh,H., Lagutin,O.V., and Oliver,G.** (2002). Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* **129**, 2835-2849.
- Zuber,M.E., Gestri,G., Viczian,A.S., Barsacchi,G., and Harris,W.A.** (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155-5167.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Heinz Wässle danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Abteilung Neuroanatomie am MPI für Hirnforschung anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Hermann Rohrer danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Dorothea Schulte für die kompetente Betreuung, ihre Unterstützung, die immerwährende Motivation, ihre Geduld und die fruchtbaren Diskussionen.

Für ein außergewöhnlich tolles Arbeitsklima bedanke ich mich bei meinen ehemaligen sowie derzeitigen Kollegen aus der Neuroanatomie und anderen Abteilungen. Christa danke ich auch insbesondere für ihre Unterstützung im Labor.

Vielen Dank für die Einführung in diverse biochemische Arbeitstechniken an Dr. Ben Marquez-Klaka, Dr. Annette Nicke, Ivana Mesic und Dr. Ingo Paarmann aus der neurochemischen Abteilung.

Malte Schürken von der J.W.G-Universität möchte ich für die massenspektrometrischen Analysen danken.

Tine und Julia: Vielen Dank für die zahlreichen, aufmunternden Gespräche und eure Ratschläge!

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für den stetigen und liebevollen Rückhalt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Zsuzsa Agoston, diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Frankfurt am Main, den

Zsuzsa Agoston

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Vorname: Zsuzsa
Nachname: Agoston
Geburtsdatum: 10. Juli, 1979
Geburtsort: Tirgu Mures, Rumänien
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Wittelsbacherallee 143
60385 Frankfurt am Main
Email: agoston@mpih-frankfurt.mpg.de

AUSBILDUNG

seit 2006 Doktorarbeit „Die Rolle von Meis2 als Ko-Transkriptionsfaktor bei der Entwicklung des anterioren Zentralnervensystems“ am MPI für Hirnforschung, Frankfurt am Main, Abteilung Neuroanatomie. (Betreuer: Prof. Dr. Heinz Wässle und PD Dr. Dorothea Schulte)

2005 Diplomarbeit „Die Rolle von Meis1 und Meis2 bei der Frühentwicklung des ZNS der Wirbeltiere“ am MPI für Hirnforschung, Frankfurt am Main, Abteilung Neuroanatomie. (Betreuer: Prof. Dr. Leo Peichl und PD Dr. Dorothea Schulte)

1999 – 2005 Studium der Biologie (Diplom), Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main

1996 – 1999 Wöhler-Gymnasium, Frankfurt am Main (Abitur)

1990 – 1996 Georg-Büchner-Gymnasium, Bad Vilbel

STIPENDIEN

2007 – 2009 Promotionsstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes

PUBLIKATIONEN

Agoston Z and Schulte D. Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4/Grg4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of an secondary MHB organizer. Development, eingereicht.

Bobak N, Agoston Z, Schulte D. (2009) Evidence against involvement of Bmp Receptor 1b signaling in fate specification of the chick mesencephalic alar plate after the 9-10 somite stage. *Neuroscience Letters*, in Revision.

Vennemann A, Agoston Z, Schulte D. (2008) Differential and dose-dependent regulation of gene expression at the mid-hindbrain boundary by Ras-MAP kinase signaling. *Brain Res.* 1206:33-43.

Mühleisen TW, Agoston Z, Schulte D. (2006) Retroviral misexpression of cVax disturbs retinal ganglion cell axonfasciculation and intraretinal pathfinding in vivo and guidance of nasal ganglion cell axons in vitro. *Dev Biol.* 297(1):59